



UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

**AZ ACETIL-L-KARNITIN NEUROPROTEKTÍV
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ISCHEMIÁS MODELLEKEN**

Ph.D. értekezés

Kocsis Kitti Anita

Témavezetők:

Dr. Farkas Tamás
egyetemi docens

Prof. Dr. Toldi József
tanszékvezető egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

**2015
SZEGED**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	6
Az ischemiás stroke előfordulása és patofiziológiája.....	6
Az ischemia modellezése: 2VO és OGD modellek.....	10
A szinaptikus plaszticitás és a dendrittüskék.....	13
A karnitinek előfordulása és szerepe a szervezetünkben.....	19
Az acetyl-L-karnitin jellemzői és legfontosabb szerepei	25
Kitekintés néhány ALC-vel kezelt neurodegeneratív elváltozásra.....	30
Célkitűzések	34
Anyagok és módszerek.....	36
A kísérletek során felhasznált állatok	36
A két-ér elzárásos (2VO) modell.....	36
Az első kísérletsorozat csoportjai, kezelések acetyl-L-karnitinnel	37
<i>In vitro</i> elektrofiziológia	37
Golgi-Cox impregnációs technika	40
Golgi-Cox festőoldat elkészítése	40
Kodak fixáló oldat elkészítése	40
Metszetek készítése, festése	40
A dendrit tüskék kvantitatív analízise	41
Oxigén-glükóz depriváció (OGD), azaz az <i>in vitro</i> ischemia előidézése.....	42
ALC-vel történő kezelések az OGD modellen végzett kísérletekben	43
Az ALC hatásmechanizmusának vizsgálata.....	43
Alkalmazott statisztikai módszerek	44

Eredmények.....	45
A 2VO-s kísérletsorozat elektrofiziológiai eredményei	45
A 2VO-s kísérletsorozat hisztológiai eredményei	49
Az OGD modell paramétereinek beállítása	51
Az ALC hatásának vizsgálata OGD modellen: fEPSP regeneráció és LTP.....	55
Az ALC hatása mögött húzódó lehetséges útvonal vizsgálata	64
Eredmények megbeszélése.....	67
Következtetések	79
Összefoglalás.....	81
Summary	85
Irodalomjegyzék.....	89
Köszönetnyilvánítás	104
Tudományos közlemények listája	105

Rövidítések jegyzéke

2VO: 2-ér elzárás (2-vessel occlusion)
acil-Ko-A: acil-Koenzim A
Ac-Ko-A: acetil-Koenzim A
aCSF: mesterséges cerebrospinális folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AD: Alzheimer-kór (Alzheimer disease)
AIF: apoptózis indukáló faktor
ALC: acetil-L-karnitin (acetyl-L-carnitine)
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav
APAF-1: apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1
APP: β -amiloid prekursor fehérje (amyloid precursor protein)
ARTN: artemin
ATP: adenozin-trifoszfát
B^(0,+): glikoprotein-asszociált aminosav transzporter b0, +AT1
Bad: Bcl-2-asszociált halál promóter (Bcl-2-associated death promoter)
BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)
BDNF: agyi eredetű neurotróf faktor (brain-derived neurotrophic factor)
CACT: karnitin-acilkarnitin-transzlokáz (carnitine-acylcarnitine translocase)
CAM: sejtheadhéziós molekula (cell adhesion molecule)
CaMKII: Ca/kalmodulin-függő kináz II
CaMKIV: Ca/kalmodulin-függő kináz IV
CAT: karnitin-acetiltranszferáz (carnitine-acetyltransferase)
cca: arteria carotis communis (common carotid artery)
Cit-c: citokróm-c
CPT: karnitin-palmitoil-transzferáz (carnitine-palmitoyltransferase)
CREB: cAMP-válaszelem kötő (cAMP-response element binding)
CSD: kérgi kúszó depresszió (cortical spreading depression)
DV: desztillált víz
eca: arteria carotis externa (external carotid artery)
EPSP: serkentő posztzinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)
ETC: elektrontranszport lánc (electron transport chain)
fEPSP: serkentő posztzinaptikus mezőpotenciál (field excitatory postsynaptic potential)
GABA: γ -amino-vajsav (γ -amino-butiric acid)
Glu: glutamát
HD: Huntington-kór (Huntington's disease)
HI: hipoxia-ischemia
HO-1: hemoxigenáz-1
Hsp: hősokk fehérje (heat shock protein)
ica: arteria carotis interna (internal carotid artery)
i.p.: intraperitoneális

IL-1: interleukin-1
 Ko-A: Koenzim A
 LTP: hosszútávú potencírozódás (long-term potentiation)
 MCAO: középső agyi artéria okklúziója (middle cerebral artery occlusion)
 MDD: major depresszió (major depressive disorder)
 MIM: belső mitokondriális membrán (mitochondrial inner membrane)
 MOM: külső mitokondriális membrán (mitochondrial outer membrane)
 NGF: idegi növekedési faktor (nerve growth factor)
 NH₄OH: ammónium-hidroxid
 NMDA: N-metil-D-aszpartát
 OCTN: szerves kation/karnitin transzporter (carnitine/organic cation transporter)
 OGD: oxigén-glükóz depriváció
 PDH: piruvát-dehidrogenáz
 PDK: foszfoinozítid-függő protein-kináz (phosphoinositide-dependent kinase-1)
 PET: pozitron emissziós tomográf
 PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz
 PID: infarktus körüli depolarizáció (peri-infarct depolarisation)
 PIP2: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
 PIP3: foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
 PKB: protein kináz B
 PKC: protein kináz C
 PKM ζ : protein kináz M zéta
 PLC: palmitoil-L-karnitin (palmitoyl-L-carnitine)
 post-iLTP: post-ischemiás LTP
 PSD: posztzinaptikus denzitás
 PTP: átmeneti permeabilitási pórus (permeability transition pore)
 ROS: reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
 rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor (recombinant tissue plasminogen activator)
 TBS: nagy frekvenciás ingerlés, theta burst stimuláció
 TNF- α : tumor nekrozis faktor- α
 t-PA: szöveti plazminogén aktivátor (tissue plasminogen activator)

Bevezetés

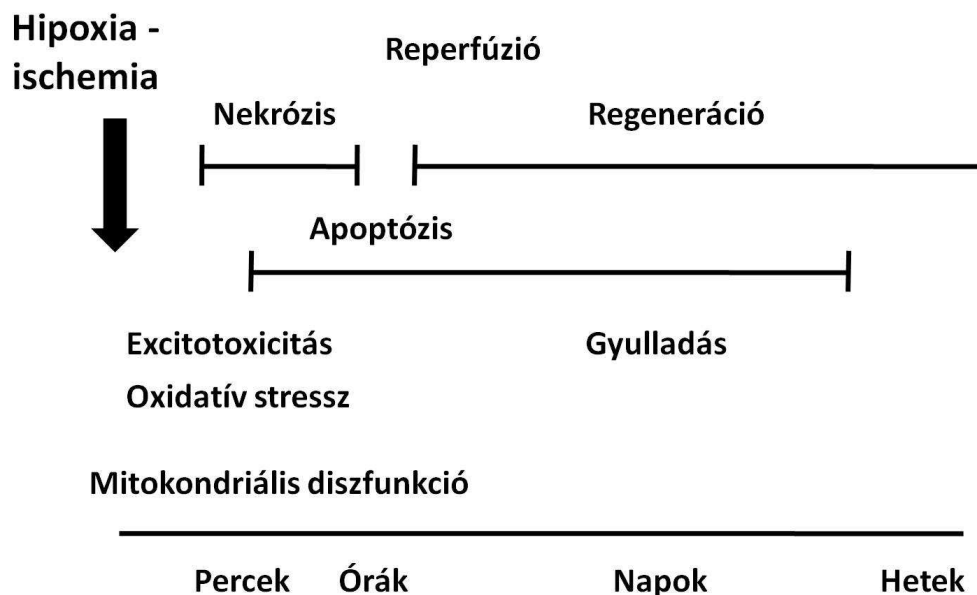
Az ischemiás stroke előfordulása és patofiziológiája

Az ischemiás stroke által indukált agyi károsodásokat több patofiziológiai folyamat bonyolult kölcsönhatása okozza. Évente mintegy 15.000.000 stroke-os esetet regisztrálnak világszerte, melyből megközelítőleg 6.000.000 halálos kimenetelű (WHO és WHF). A stroke-os esetek 87%-át az érelzáródás következtében fellépő ischemiás stroke míg, a maradék hányadot az intracerebrális artériák sérüléséből, vérzéséből származó haemorrhágiás stroke teszi ki (Beal, 2010).

Az ischemiás stroke háttérmechanizmusainak, és ok-okozati viszonyainak ismeretében lehetőségünk nyílik új diagnosztikai és terápiás eljárások kidolgozására. Az ischemia következtében kialakuló excitotoxicitás, acidotoxicitás, az ionháztartás felborulása, a szabadgyökök okozta oxidatív stressz, a gyulladás és az apoptózis a neuronok pusztulásához vezet (Gonzalez, 2006). A hipoxiát kísérő patofiziológiai folyamatokat eltérő időablakok jellemzik, egyesek az érelzáródást követően percekkel, mások csak napokkal később jelentkeznek (1. ábra).

Globális ischemiát követően a mitokondriális ATP szintézis leáll, és a már meglévő, rendelkezésre álló ATP is 2 percen belül felhasználásra kerül. Ez a neuronok sejtmembránjának depolarizációját okozza, a K^+ -ok kilépnek az extracelluláris térbe, a Na^+ -ok pedig nagy mennyiségben áramlanak a sejtekbe (Caplan, 2000). Ischemia során a Ca^{2+} -ATP-áz működése is zavart szenved, így nem képes fenntartani a fiziológiás körülmények között jellemző nagyon alacsony, kb. 10-100 nM-os intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, s ez akár 50-100 μ M-ra is megemelkedhet. A magas Ca^{2+} koncentráció számos Ca-függő proteázt, lipázt és DN-ázt aktivál (Edvinsson és Krause, 2002). Ezek az enzimek olyan katabolikus folyamatokat közvetítenek, melyek végül a sejtek pusztulásához/nekrózishoz vezetnek (Doyle és mtsai., 2008). Az ionikus egyensúly felborulását követő tartós membránde polarizáció neurotranszmitterek, elsősorban a serkentő glutamát (Glu) felszabadulását indukálja, amely az ischemia patomechanizmusának kulcsfontosságú eleme. A pre- és posztzinaptikus membránokon elhelyezkedő Na^+ -függő Glu-transzporterek fiziológiás körülmények között nagy koncentráció grádiens tartanak fenn a sejtmembrán két oldala között. A szinaptikus részben mikromoláris Glu koncentráció jellemző, míg a citoszólban ez az érték elérheti a 10 mM-t is (Hsu, 1998). Ischemia során azonban a membránde polarizáció és a Na^+ -ok

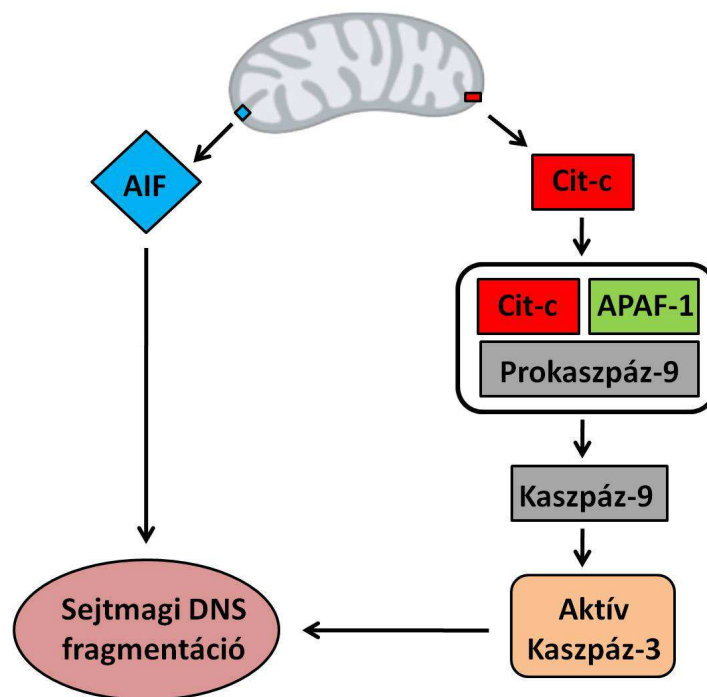
intracelluláris felhalmozódása miatt e transzporterek működése megfordul, így a Glu a koncentrációgrádiens mentén kilép a neuronokból (Doyle és mtsai., 2008). A szinaptikus részbe kijutott Glu a posztszinaptikus sejten elhelyezkedő receptorait, az N-metil-D-aszpartát (NMDA) és az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) receptorokat hiperaktiválja. Ennek eredményeként a receptor ioncsatornáin át egy fokozott mértékű Ca^{2+} beáramlás indul meg, ami további depolarizációhoz vezet. Ezt az intracelluláris Ca^{2+} túltöltöttséggel járó folyamatot, mely végül sejtpusztulást indukál, Glu-mediált excitotoxicitásnak nevezzük (Olney, 1969). Az állapotot tovább súlyosbítja a Ca^{2+} -ok intracelluláris raktárakból (pl.: mitokondriumból, endoplazmatikus retikulumból) való felszabadulása, melyhez feltehetően a metabotróp Glu receptorok aktiválódása is hozzájárul (Lyden és Wahlgren, 2000).



1. ábra: A hipoxiás-ischemiás agysérülést követően fellépő legfontosabb mechanizmusok és azok időbeli megjelenése (Ten és Starkov, 2012 nyomán módosítva).

Az excitotoxicitás kiváltása mellett a sérült mitokondriális működésnek az oxidatív stresszben és az apoptózisban is központi szerepe van. A mitokondriális átmeneti permeabilitási pórus (PTP) egy körülbelül 2 nm átmérőjű, multiprotein komplexből álló csatorna, mely a külső és a belső mitokondriális membránt köti össze (Halestrap, 1999). Ezek a pórusok minden 1.5 kDa-nál kisebb anyagot (pl. ionokat) átengednek (Halestrap és mtsai., 2002), és nyitásukat az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megnövekedése vagy akár az oxidatív stressz is indukálhatja. A mitokondriális PTP fiziológiai körülmények között részt

vesz a mitokondriumon belül a Ca^{2+} koncentráció és a pH szabályozásában is. Kóros állapotokban a pórust alkotó proteinkomplexek konformációváltozáson esnek át, melynek hatására megnő a PTP átmérője. Ilyen állapotban már a nagyobb méretű, pl. apoptotikus szignalizációs molekulák is átjuthatnak rajta (Halestrap és mtsai., 2004), s így elindíthatják az intrinsic apoptotikus útvonalakat. Ilyen molekula pl. a citokróm-c, mely a mitokondrium belső teréből a citoplazmába kerülve a prokaspáz-9-cel és az apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1-gyel (APAF-1) kialakít egy apoptoszómát. Ez aktiválja a kaspáz-9-et, amely további prokaspázok hasításával újabb kaspázok aktiválódását eredményezi. A kaspáz-3 és az egyéb kaspázok egyik fontos funkciója az, hogy proteolízissel inaktiválják a kaspáz-aktivált DN-áz gátló fehérjét (Hengartner, 2000; Krantic és mtsai., 2007; Kroemer és mtsai., 2007). Az inhibitor fehérje degradációját követően a kaspáz-aktivált DN-áz a sejtmagba transzlokálódik, ahol katalizálja a DNS 180-200 bázispáros fragmentumokra történő feldarabolódását (2. ábra).



2. ábra: A mitokondrium intermembrán teréből felszabaduló fehérjék hozzájárulnak az apoptózis kialakulásához. Az apoptózis intrinsic útjának beindításához szükséges kulcsfontosságú fehérje a citokróm-c, mely az APAF-1-gyel és a prokaspáz-9-cel egy úgynevezett apoptoszómát alkot. Ez hozzájárul a különböző kaspázok, különösképpen a kaspáz-3 aktiválódásához, mely végső soron a sejtmagon belül a DNS fragmentálódásához vezet. Az apoptózis kaspáz-független útvonalának aktiválódásában fontos az AIF fehérje, mely egyéb proteinekkel interakcióba lépve szintén a DNS degradálódását idézi elő (ez esetben nagyobb fragmentumok keletkeznek, mint a kaspáz-függő apoptózis során). Rövidítések: AIF – apoptózis indukáló faktor, Cit-c – citokróm-C, APAF-1 – apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1 (Sims és Muyderman, 2010 nyomán módosítva).

Ischemia esetén, főként ha az inzultust követően a reperfúzió is bekövetkezik, az oxidatív stressz mind a nekrózis, mind az apoptózis kialakulásában fontos tényező (Doyle és mtsai., 2008; Mehta és mtsai., 2007). A mitokondrium a fő színtere a szuperoxid képződésnek, amely ischemia során és azt követően nagymértékben hozzájárul az oxidatív stresszhez. A szuperoxid a nitrogén-monoxiddal reakcióba lépve peroxinitritet alkot, mely további sejtkárosodást, úgynevezett nitrozatív stresszt eredményez. Mivel a szabadgyökök/reaktív oxigén gyökök (ROS) aktiválják a mátrix metalloproteázokat, amelyek bontják a kapillárisok bazális laminájának fő alkotóit, a kollagént és a laminint, így meghatározó szerepet játszanak az érfal reperfúziós sérülésében is. Hatásukra csökken az érfal integritása és fokozódik a vér-agy gát (BBB) permeabilitása (Crack és Taylor, 2005).

Az ischemia következtében fellépő sérült mitokondriális működés és az antioxidáns védelmi rendszer sérülése fokozott ROS termeléshez vezet már az inzultus kezdeti szakaszában. A reperfúziót követően szintén nagymennyiségű ROS szabadul fel, amely többek között az elhúzódó gyulladásos folyamatok kialakításában is központi szerepet játszik. Az oxidatív stressz az agy számára különösen veszélyt jelent. Ez a magas többszörösen telítetlen zsírsav tartalmának, a fokozott metabolikus aktivitásának és a viszonylag alacsony szintű antioxidáns-kapacitásának köszönhető (Halliwell, 2006).

Fokális ischemia esetén jelentkezhet az úgynevezett infarktus körüli depolarizáció (PID) is. A PID spontán depolarizációs hullámokból áll, csakúgy, mint a kérgi kúszó depresszió (CSD). A PID valószínűleg az ischemiás core-ból (az inzultus által közvetlenül érintett területről) felszabaduló K^+ -ok és a serkentő aminosavak hatására alakul ki, majd az ezt körülvevő penumbrán keresztül végigterjed az agyon. A PID általi ismételt depolarizáció a penumbra területén további szöveti károsodást vált ki azáltal, hogy elősegíti a neuronok Ca^{2+} felhalmozását. Ismert, hogy a PID megjelenik a stroke különböző állat modelljeiben, ahol azt is leírták, hogy a CSD előfordulása és időtartama korrelációt mutat az infarktus kiterjedésével (Strong és mtsai., 2000).

A stroke-ot követő gyulladásos válaszban különböző sejttypusok, gyulladásos mediátorok és extracelluláris receptorok vesznek részt, melyek további sérülést idéznek elő. Az ischemiás agyban a neutrofil granulociták a vérerekhez tapadnak és aktiválódnak. Ezután a szöveti sérülés elsődleges közvetítőiként ROS-t termelnek és proteolitikus enzimek felszabadulását idézik elő. Mindkét mechanizmus meghatározó a szövetek reperfúziós

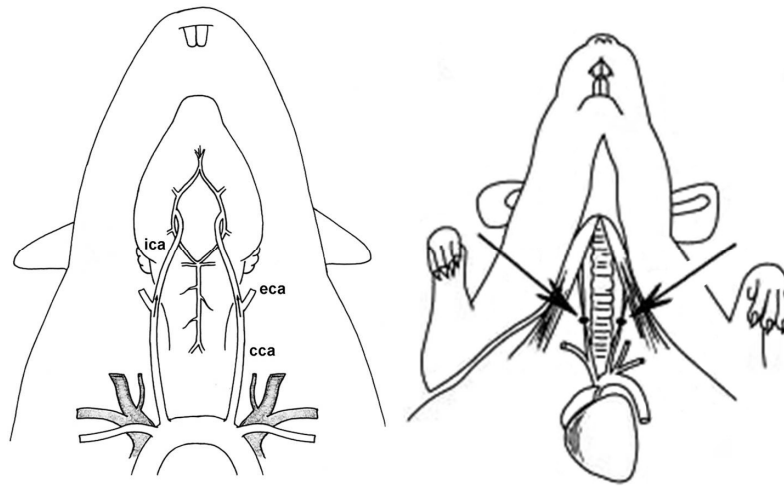
károsodásában. A neutrofil granulociták a mikrocirkulációt is akadályozzák, amely meggátolja az agyi vérátáramlás reperfúziót követő teljes helyreállítását (Huang és mtsai., 2003). A limfociták szintén felelősek az ischémiát követő agyi károsodás kialakulásáért. Annak ellenére, hogy fiziológiás körülmények között ezek a sejtek a központi idegrendszerbe nem jutnak be, az ischémiát követően 24 órán belül megjelennek az agyban, és súlyosan károsítják az agyi ereket (Schroeter és mtsai., 1994). Az ischémiát követő gyulladásos folyamatok kialakulásában a citokineknek és kemokineknek szintén meghatározó szerepük van (Gong és mtsai., 1998). A citokinek közül az interleukin-1 (IL-1) termelése a mikrogliaiban, asztrocitáiban és neuronokban egyaránt fokozódik. Az IL-1 többek között hozzájárul a láz kialakulásához, és az excitotoxicitás fokozódásához (Huang és mtsai., 2003). Állatkísérletes és humán vizsgálatokból nyert adatok egyaránt alátámasztják, hogy a TNF- α mennyisége korrelál az ischémiás sérülés súlyosságával. Az ischémiás stroke-ot követő 24 órán belül a szintje jelentősen megemelkedik az agy-gerincvelői folyadékban, ami pozitív korrelációt mutat a sérülés kiterjedésének mértékével (Zaremba és mtsai., 2001). A TNF- α különböző módon fejti ki hatását. Megszakíthatja a BBB integritását, aktiválhat különböző gyulladásos mediátorokat, vagy olyan adhéziós molekulákat, amelyek segítik a neutrofil granulociták kitapadását és transzmigrációját.

Az ischémia modellezése: 2VO és OGD modellek

Klinikailag bizonyított, hogy a stroke-on átesett páciensek legnagyobb részénél az agykárosodás létrejöttének van egy elhúzódó, késői szakasza is, amely az inzultust követően órákkal-napokkal később jelentkezik csak. Ez a viszonylag szűk időablak – úgynevezett terápiás ablak – lehetőséget biztosít a klinikai beavatkozásra, amelynek végső célja az ischémia és a reperfúzió által okozott szöveti károsodás kiterjedésének minimalizálása (Legos és Barone, 2003). Bár az ischémiás stroke-kal kapcsolatban hosszú ideje folynak intenzív kutatások, az inzultuson átesett páciensek megfelelő kezelése egyelőre megoldatlan probléma. Jelenleg egyetlen terápiás hatóanyag van a klinikumban az akut ischémiás stroke kezelésére, melyet az Egyesült Államok Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (Food and Drug Administration, FDA) elfogadott. Ez nem más, mint a rekombináns szöveti plazminogén aktivátorral (rt-PA) végrehajtott trombolízis, amellyel az ischémiás szövet vérátáramlása, ezáltal pedig glükóz- és oxigénellátása állítható helyre (Jahan és Vinuela,

2009). A kezelés nyomán újrainduló perfúzió (reoxigenizáció) során fellépő oxidatív stressz azonban újabb szöveti károsodást okoz, melynek kivédése jelenleg még nem megoldott. További korlátozó tényező az rt-PA-val történő kezeléssel szemben az, hogy rendkívül szűk terápiás ablakkal rendelkezik (3-4.5 óra), és emiatt (illetve egyéb tényezőkből kifolyólag) a páciensek töredéke, jó esetben is csupán 2-5%-a részesülhet a kezelésben (Donnan és mtsai., 2011). Mindemellett az esetleges intracerebrális vérzés is rendkívül nagy rizikófaktort jelent. Épp ezért az újabb és újabb hatóanyagok, neuroprotektív stratégiák kidolgozása és tesztelése elengedhetetlen a különböző kísérletes ischemia modellekben. Bár a tipikus humán stroke-os események tanulmányozásában a fokális ischemia modelleknek van nagyobb jelentősége, a teljes agyat érintő, úgynevezett globális ischemiás inzultusok vizsgálata is nélkülözhetetlen. Az utóbbi eset áll fenn például hirtelen szívmegállás vagy légzéselégtelenség, úgynevezett asphyxia esetén (McBean és Kelly, 1998). A laboratóriumi vizsgálatok során a rágcsálók (pl.: patkány, egér) alkalmazása a legelterjedtebb, mivel ezek agyi keringési anatómiája nagyban hasonlít az emberéhez (Woolsey és mtsai., 1996). Számos olyan kísérleti elrendezéssel találkozhatunk a szakirodalomban, melyek a fokális és a globális ischemia során bekövetkező változásokat hivatottak modellezni. Előbbire példa a középső agyi artéria elzárásán (MCAO) alapuló műtéti technikák, utóbbira pedig az agyat vérrel ellátó nagyobb erek okklúziójával előidézett állapotok, vagy az *in vitro* modellek. Doktori munkám központi részét a globális ischemiás inzultusok vizsgálata képezte, ezért a továbbiakban a kísérleteim során alkalmazott modelleket fogom részletesen bemutatni.

Az általános altatás mellett végzett 2-ér elzárásos (2VO) műtéttel egy globális hipoperfúziós állapot idézhető elő, amely humán vonatkozásban a carotisok elmeszesedése nyomán kialakuló csökkent vérátáramlást modellezi. A 2VO során az arteria carotis communisok (cca) elzárása történik (3. ábra), melynek következtében patkányoknál az agy vérátáramlása a fiziológiás érték megközelítőleg egy harmadára esik vissza (Farkas és mtsai., 2007).



3. ábra: A 2VO műtéti elrendezés. Az agyat vérrel ellátó legfontosabb ér a cca, melynek okklúziójával egy globális hipoperfúziós állapot érhető el. Rövidítések: cca – arteria carotis communis, eca – arteria carotis externa, ica – arteria carotis interna (Farkas és mtsai., 2007; Irikura és mtsai., 1996 nyomán módosítva).

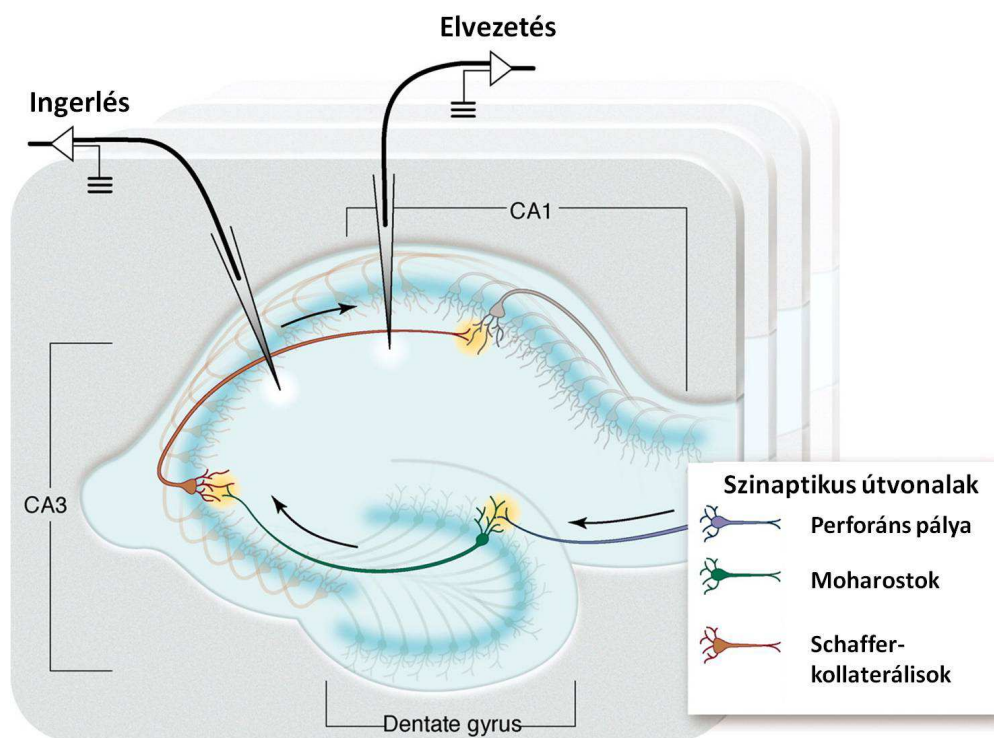
Bár ezen inzultus következtében az agyi vérrellátás nem csökken az ischemiás küszöbérték alá (hiszen a Willis-kör az arteria basilaris felől biztosítja a vérátfolyást), így sejtpusztulás nem detektálható (Klocke és mtsai., 2007; Sicard és Fisher, 2009), de az agy érzékenyebb területein a hipoperfúzió mégis előidéz funkcionális változásokat. A hippocampus CA1-es régiójában 2VO-t követően kimutatható a hosszútávú potencírozódás (LTP) csökkenése (Mori és mtsai., 1998), valamint a piramissejtek apikális dendritjén a spine-ok számának redukálódása (Jia és mtsai., 2012). Ezekkel a megállapításokkal összhangban vannak a kutatócsoportunk által hasonló elrendezésben kapott korábbi eredmények (Marosi és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2011).

A globális ischemia által okozott károsodások vizsgálatára széles körben elterjedtek a különböző *in vitro* modellek. Ezeket végezhetjük többek között hippocampális agyszeleteken, embrionális vagy újszülött patkányokból és egerekből nyert kortikális, hippocampális vagy cerebelláris neuronális vagy gliális sejt kultúrákon, melyeken az ischemia-szerű állapotot az úgynevezett oxigén-glükóz depriváció (OGD) által idézhetjük elő. Ennek során a normál, oxigént és glükózt tartalmazó médiumot vagy perfúziós folyadékot az ischemiás periódus alatt egy módosított összetételű folyadék helyettesíti, amelyben nincs glükóz és az oxigént nitrogén helyettesíti (Woodruff és mtsai., 2011). Az *in vitro* modellek sok tekintetben különböznek az *in vivo* előidézett ischemiától. Mivel nincsenek jelen vérerek és ezáltal vérátáramlás, számos, egyébként jelentkező funkcionális és strukturális változás hiányzik ezekből a rendszerekből (pl.: a gyulladásos sejtek infiltrációja). Egy másik tipikus jellemvonása az *in vitro*

módszereknek, hogy a neuron-pusztuláshoz jóval hosszabb időtartamú inzultusra van szükség, hiszen az ATP raktárak kiürülése lassabban zajlik, és a Glu-felszabadulás is sokkal jobban elhúzódik az *in vivo* ischemiás inzultushoz képest (Taoufik és Probert, 2008; Yuan, 2009). Annak ellenére, hogy az *in vivo* és *in vitro* globális ischemiás rendszerek között több tulajdonságban is találunk különbségeket, a meglévő hasonlóságok mégis alkalmassá teszik az *in vitro* rendszereket az inzultus, illetve lehetséges protektív farmakonok vizsgálatára. Segítségükkel jól ellenőrizhető, egyszerű rendszerben követhetők nyomon azok az alapvető fontosságú, jól jellemezhető információk, melyek az oxigén és glükóz hiányára kialakuló sejtes válaszokat jellemzik.

A szinaptikus plaszticitás és a dendrittüskék

A szinaptikus plaszticitás a neuronok között meglévő kapcsolatok aktivitás-függő megváltozása, mely a tanulás és memória folyamatok alapját szolgáltatja. Az emberi agy huzalozásában mintegy 10^{12} neuron és 10^{15} szinapszis vesz részt. Ezek az elemek teremtik meg a celluláris alapját az érzékelésnek, az emócióknak, a gondolatoknak és a viselkedésnek. Bár az egyes fajokban az idegrendszeri struktúra felépítése, azaz huzalozottsága genetikailag meghatározott, a különböző stimulusok hatására mindez nagymértékben átrendeződhet (Ho és mtsai., 2011). A szinaptikus plaszticitás tanulmányozásához „tanulékony” kísérletes modellek szükségesek, melyeket jól azonosítható neuronok meghatározott populációi alkotnak. Fontos, hogy ezeken a rendszereken genetikai és molekuláris sejtbiológiai módosítások, valamint elektrofiziológiai vizsgálatok is végrehajthatóak legyenek. A felnőtt gerinces idegrendszerben meglévő szinaptikus plaszticitás tanulmányozására egy általánosan alkalmazott modell a rágcsálók hippocampusa, amely a memória kialakulásában kulcsfontosságú struktúra. A hippocampus anatómiai sajátosságai (a neuronok szabályos rendezettsége, jól karakterizálható szinaptikus útvonalak) kifejezetten alkalmassá teszik ezt a struktúrát az elektrofiziológiai vizsgálatokra. A plaszticitás a három hippocampális útvonal (perforáns pálya, moharostok és Schaffer-kollaterálisok) mindegyikén tanulmányozható (4. ábra), ahol a különböző paraméterekkel rendelkező ingerlési stimulusokra változások mutatkoznak a szinaptikus áttevődés hatékonyságában (Ho és mtsai., 2011).



4. ábra: A hippocampus és a szinaptikus plaszticitás vizsgálatok során alkalmazott elektródák helyzetének sematikus ábrázolása. A 3 fő hippocampális régióban (gyrus dentatus, CA3 és CA1) a sejttestek diszkrét szomatikus réteget (sötétkék vonal), az axonok pedig jól meghatározott dendritikus régióba projektáló pályákat alkotnak. A perforáns pálya (lila) az entorhinális kéreg felől érkező axonokat tartalmazza, melyek a gyrus dentatus szemcsesejtjein szinaptizálnak (sárga kör). A szemcsesejt axonjait, melyeket moharostoknak nevezünk (zöld), a CA3-as régióba küldik, ahol a piramissejtekkel lépnek kapcsolatba (sárga kör). A CA3-as projekciók, vagyis a Schaffer-kollaterálisok (barna) a CA1-es piramissejteken végződnek (sárga kör). Az afferens rostok ingerlésének hatására a posztzinaptikus sejteken bekövetkező válasz regisztráló elektródok segítségével mérhető (az ábrán a CA3-CA1-es szinaptikus útvonal vizsgálata során alkalmazott pozicionálás van feltüntetve) (Ho és mtsai., 2011 nyomán módosítva).

Ilyen a magas frekvenciás ingerlés hatására bekövetkező hosszútávú potencírozódás, amely a szinapszisok megerősödésével és az áttevődés hatékonyságának fokozódásával jár. Az LTP képezi a memória kialakulásának neuronális alapját, és a jelenség leírása Bliss és Lomo nevéhez fűződik (Bliss és Lomo, 1973). A hippocampus CA1-es régiójában kialakuló LTP molekuláris mechanizmusa intenzív kutatás tárgya volt, melynek során megállapítást nyert többek között az, hogy a pre- és posztzinaptikus neuronok együttes aktiválódását igényli (Bliss és Collingridge, 1993), valamint az, hogy az NMDA receptorokon keresztül történő Ca^{2+} beáramlás kulcsfontosságú (Collingridge és mtsai., 1983; Morris és mtsai., 1986; Sakimura és mtsai., 1995). A kémiai szinapszisokban lezajló kommunikáció három fő részre osztható: a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulásra, a szinaptikus résben történő diffúzióra, valamint a posztzinaptikus receptorokon való kötődésre. A preszinaptikus sejt

úgynevezett aktív zónájában vázfehérjéket, elektrondenz mátrix elemeket, valamint a neurotranszmitterrel töltött szinaptikus vezikulákat találjuk. A vezikulák aktin citoszkeletonhoz, és egymáshoz történő kihorgonyzását a szinapszin nevű foszfoproteinek segítik elő, melyeket a neuronális stimuláció során aktiválódó kinázok foszforilálnak. A szinapszinoknak fontos szerepük van a neurotranszmitter-felszabadulás során elérhető szinaptikus vezikulák számának szabályozásában (Cesca és mtsai., 2010). A mintegy 20 nm-es szinaptikus résben történik meg a neurotranszmitterek diffúziója a preszinaptikus terminális irányából a posztzinaptikusan elhelyezkedő receptorok felé. Továbbá olyan sejtdhéziós molekulák (CAM) találhatók ezen a területen, melyek a szinapszisok összetartásáért felelősek. A CAM-ok egy specifikus családjának, a receptor tirozin kináz efrineknak, valamint receptorainak fontos szerepe van a hippocampális szinaptikus plaszticitásban (Lai és Ip, 2009). Köztük találunk olyanokat, melyek az NMDA receptorok elhelyezkedését és működését egyaránt képesek szabályozni, ezáltal pedig a szinaptikus kapcsolatok erősségét befolyásolják (Contractor és mtsai., 2002). A szinaptikus résnek további fontos funkciója a transz-szinaptikus szignalizáció biztosítása a retrográd messegerek révén. Ilyen molekulák például az endokannabinoidok, melyek a szinaptikus plaszticitást mind a gátló, mind pedig a serkentő szinapszisoknál képesek befolyásolni (Heifets és Castillo, 2009). A posztzinaptikus oldalon felszabaduló, preszinaptikus sejtek neurotranszmitter leadását befolyásoló molekulák között említhetjük a nitrogén-monoxidot (O'Dell és mtsai., 1991), vagy akár az arachidonsavat is (Barbour és mtsai., 1989). Ultrastrukturális szinten a posztzinaptikus komponens egy elektrondenz kompartment, az úgynevezett posztzinaptikus denzitás (PSD) képezi, mely a dendrittüskén foglal helyet. A dendrittüskék vagy spine-ok az agyban a legtöbb principális neuronon megtalálhatók, a serkentő szinapszisok 90%-ának posztzinaptikus oldalát adják. Ezek a speciális membránkitüremkedések változatos alakokat ölthetnek, ezáltal biztosítva a szinaptikus plaszticitás morfológiai alapját. Lehetnek vékonyak, zömökek, gomba alakúak vagy csésze formájúak (Harris és mtsai., 1992), de az általános felépítésükre jellemző, hogy a dendrit ággal egy vékonyabb nyaki rész áll kapcsolatban, melynek folytatása egy kiterjedtebb feji régió. A nyaki rész átmérője mindössze 0.1 μm , a dendrittüske fejének térfogata pedig megközelítőleg 0.01-1 μm^3 (Harris és Kater, 1994), ami a szinaptikus kapcsolat erősségével korrelációt mutat (Holtmaat és Svoboda, 2009; Kirov és Harris, 1999). A feji rész felszínének mintegy 10%-át foglalja el a preszinaptikus aktív zónával szemben elhelyezkedő PSD, amely helyet biztosít a neurotranszmitter receptorok (pl.:

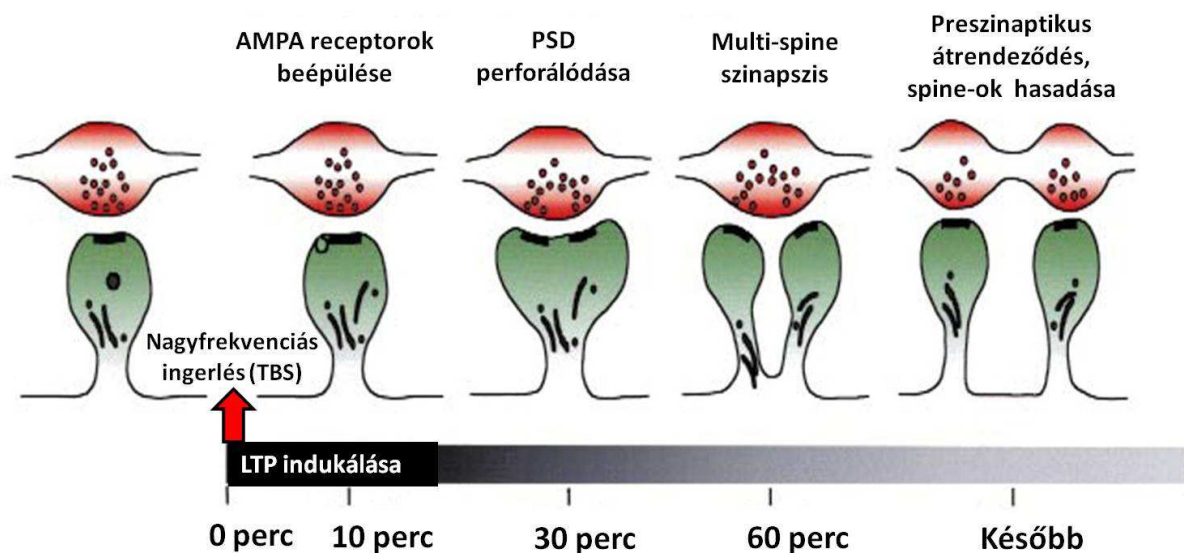
AMPA, NMDA receptorok), vázfehérjék és asszociált szignalizációs molekulák számára. A PSD vastagsága megközelítőleg 40 nm, az átmérője pedig átlagosan 360 nm, ami azonban az afferens szinaptikus aktivitás hatására szintén változik, így akár 800 nm is lehet (Kennedy, 2000). A dendrittüskékben és ezzel együtt a PSD-kben bekövetkező strukturális és morfológiai változások az idegi plaszticitás fontos elemét képezik az agyban (Buchs és Muller, 1996), melyek a tanulás és emléknym rögzítés celluláris alapját képező LTP során is megfigyelhetők.

A preszinaptikus sejt aktiválódásának hatására az axonterminálisokon megtörténik a neurotranszmitterek leadása a vezikulákból. Serkentő szinaptikus kapcsolatok esetén a fő ingerület átvivő anyag a Glu, amely a szinaptikus résen átdiffundálva kötődik a posztszinaptikus oldalon elhelyezkedő receptoraihoz. Ezek közül a hippocampális szinaptikus plaszticitásban az AMPA és az NMDA receptoroknak van fontos szerepük. Mindkét receptor ligand-kapuzott ioncsatorna, és egyedi tulajdonságaik révén a plaszticitás más-más fázisát alakítják ki. Az NMDA receptorok ioncsatornáján keresztül Ca^{2+} beáramlás történik a sejtekbe, amely elengedhetetlen az LTP indukciós fázisához. Ennek létrejöttében viszont elengedhetetlen a preszinaptikus transzmitter leadás és a posztszinaptikus depolarizáció együttes fennállása. Tehát az NMDA receptorokon keresztül nem folyik ionáramlás nyugalmi membránpotenciál értéken, hiszen az ioncsatorna pórusát egy Mg^{2+} -blokk zárja el, amely eltávolításához a fent említett két tényező egyidejű megléte szükséges. Ezzel szemben az AMPA receptorokon keresztül, a ligandkötődést követően nyugalmi membránpotenciál esetén is folyik áram, amely enyhe depolarizáló hatást vált ki, és elősegíti a Mg^{2+} -blokk távozását az NMDA receptorokból. Az AMPA receptoroknak az LTP expressziójában és fenntartásában van kiemelkedő szerepük (Ho és mtsai., 2011). Ez általánosan valósulhat meg, hogy LTP során AMPA receptorok helyeződnek ki a PSD-be, ezáltal növelve annak felszínét, valamint fokozva a szinaptikus áttevődés hatékonyságát és a szinaptikus kapcsolat erősségét. Az AMPA receptor-forgalom konstitutív módon valósul meg a reciklizációt végző endoszómák segítségével (Park és mtsai., 2004). A sejttestben vagy a posztszinaptikus régióban lokálisan szintetizálódott AMPA receptorok endoszómákba kerülnek, majd jól szabályozott mechanizmusok útján innen kerülnek ki a membránba, illetve onnan vissza. Fokozott szinaptikus aktivitás határa nagyobb mennyiségű receptor kihelyezése valósul meg, amelyek a PSD-ben történő interakciók révén kihorgonyzásra kerülnek. Az AMPA receptorok először extraszinaptikusan kerülnek ki a membránba exocitózis révén, majd egy laterális diffúziót

követően jutnak el a PSD-be, ahol már jóval alacsonyabb mértékű a mobilitásuk. Szinaptikus depresszió során megtörténik az endocitózisuk, majd vagy a korai endoszómákba kerülnek, vagy ismét beépülnek a sejtmembránba (van der Sluijs és Hoogenraad, 2011). Az AMPA receptor forgalom a neuronok bazális szintű működése során is konstitutív módon jelen van, de az aktivitás megnövekedése az aktin és miozin dinamika fokozásán keresztül serkenti a receptorok extraszinaptikus mozgását (Wang és mtsai., 2008). Az LTP indukciójához elengedhetetlen a posztszinaptikus sejtekben a Ca^{2+} koncentráció nagymértékű megnövekedése, amely többek között a másodlagos hírvivő kaszkádok aktivációját is elindítja. A hippocampus CA1-es régiójában az LTP indukcióhoz szükség van a Ca/kalmodulin-függő kináz II (CaMKII) működésére (Malenka és mtsai., 1989; Malinow és mtsai., 1989). Az autofoszforyláción átesett CaMKII a PSD-be transzlokálódik, ahol számos fehérjét, köztük a Glu receptorokat is képes foszforylálni. Az AMPA receptorok GluR1-es alegységének foszforylálása elősegíti az AMPA receptor-mediált áramokat (Barria és mtsai., 1997), tehát a posztszinaptikus membrán depolarizálódását. A Ca^{2+} koncentráció növekedés egyéb downstream szignalizációs enzimeket is aktivál, pl. a protein kináz C-t (PKC). A PKC-nek egy atípusos izoformája, az úgynevezett protein kináz M zéta (PKM ζ) kizárólag az agyban található meg. Ez az enzim konstitutívan aktív, tehát extracelluláris stimuláció hiányában is foszforylálja a célfehérjéit. A mRNS-e a dendrittüskékbe kerül, ahol a transzlációját az aktivitás-függő szignalizációs kaszkádok szabályozzák. A PKM ζ elengedhetetlen az LTP fenntartásában, tehát aktiválódása fontos részét képezi a szinaptikus plaszticitás és a memória megőrzésének (Sacktor, 2011; Shema és mtsai., 2007). A CaMKII és a PKC aktiválódása mindezek mellett a retrográd messengerek posztszinaptikus sejtekből történő felszabadulását is előidézi, melyek ezt követően fokozzák majd a preszinaptikus sejt neurotranszmitter leadását (Kandel és Schwartz, 1982). A fokozódó szinaptikus transzmisszió hatására a megnövekedett Ca^{2+} koncentráció és kalmodulin aktivitás a Ca/kalmodulin-függő kináz IV-et (CaMKIV) is aktiválja, amely ezután fokozza a cAMP-válaszelem kötő (CREB) fehérje működését a sejtmagban. Ennek hatására az LTP késői, fenntartási fázisában jellemző génexpressziós változások jönnek létre (Di Filippo és mtsai., 2008).

Az LTP mechanizmusában szereplő szignalizációs útvonalak és molekuláris események végső soron strukturális változásokat idéznek elő. Ezek nem csak a PSD-k felszínének kiterjedését foglalják magukba, hanem a spine-ok méretének növekedését, illetve a későbbiek során azok kettéválását, új dendrittüskék képződését. LTP során megnövekszik

azon szinapszisok száma, melyekben az AMPA receptorok beépülését követően megnőtt PSD perforációt mutat („perforált szinapszis”). A jelenség az elektrofiziológiai kísérletekben alkalmazott nagyfrekvenciás ingerlést követő 30 percen belül megfigyelhető (Luscher és mtsai., 2000). Egy óra elteltével a szinapszisok egy részénél a dendrittüskék kettéhasadnak, és úgynevezett multi-spine szinapszist hoznak létre. Erre a stádiumra az jellemző, hogy a két dendrittüskét egy közös nyaki régió köti össze, továbbá mindkét feji rész azonos preszinaptikus butonhoz, végződéshez csatlakozik. A folyamatot kísérő retrográd kommunikáció preszinaptikus strukturális változásokat is elindít, melynek köszönhetően a felületnövekedést szintén mutató preszinaptikus butonok is kettéválnak. Ezt a változást posztzinaptikus oldalon is követi a dendrittüskék szeparálódása (5. ábra) (Luscher és mtsai., 2000).



5. ábra: A hosszútávú potencírozódás morfológiai alapját biztosító változások időbeli lefutása az LTP indukciót követően. A fokozódó szinaptikus transzmissziót követően a posztzinaptikus oldalon AMPA receptorok épülnek be a PSD-be, melynek felülete ezáltal növekszik, majd perforálódik. Ezzel párhuzamosan a dendrittüskék is kettéhasadnak, később pedig teljesen szétválnak. Ezen változásokat a preszinaptikus oldal is dinamikusan követi, melynek eredményeként új szinapszisok jönnek létre (Luscher és mtsai., 2000 nyomán módosítva).

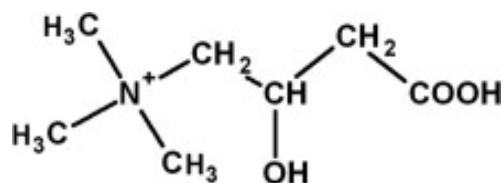
A spine-ok morfológiai változásai nem csak a normál agyi működések során alapvető fontosságúak, hanem a különböző neuropatológiás folyamatokban is. Ezek között említhetjük például az Alzheimer-kórt, a mentális retardációt, az epilepsziát vagy az ischemiát (Fiala és mtsai., 2002; Nimchinsky és mtsai., 2001; Wong, 2005). *In vitro* OGD modellben és *in vivo* globális ischemia modellben egyaránt leírták a dendrittüskék számának csökkenését,

méretükben és alakjukban bekövetkező változásokat, valamint a filopódiumszerű spine-ok képződését az inzultust követően percekben belül (Hasbani és mtsai., 2001; Jourdain és mtsai., 2002). A közelmúltban *in vivo* képalkotó eljárásokkal végzett tanulmányokban igazolták ezeket a megfigyeléseket, hiszen fokális ischémiát követően 10 percen belül bekövetkezik az apikális dendritek és spine-ok potenciálisan visszafordítható károsodása (Zhang és mtsai., 2005; Zhang és Murphy, 2007). Ezt a szakaszt a dendrittüskék elhúzóódó proliferációja követi a helyreállítás fázisában (Brown és mtsai., 2007).

Mivel a tanulás és memória sejtszintű alapját képező LTP egy érzékeny mechanizmus, ezért az ischémia során bekövetkező funkcionális változások vizsgálatára alkalmas rendszert biztosít. Bár a globális hipoperfúzió által okozott károsodások nem nyilvánulnak meg sejtpusztulásban (Marosi és mtsai., 2009), a szinaptikus áttevődés hatékonysága jelentősen csökken (Marosi és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2011). Mindemellett olyan morfológiai változások is detektálhatók, melyek szoros összefüggésben állnak a zavart szenvedett LTP-vel. Mivel a dendrittüskéken lokalizálódik az agy serkentő szinapszisainak több, mint 90%-a (Gray, 1959), ezért a rajtuk bekövetkező változások alapvetően meghatározzák a szinaptikus kommunikációt. Már a globális hipoperfúzió is hatással van a spine-okra, ugyanis az agy ischémiára érzékeny régióiban, pl. a hippocampusban megfigyelhető, hogy számuk jelentősen lecsökken (Jia és mtsai., 2012; Nagy és mtsai., 2011). Ennek köszönhetően az LTP-ben megmutatkozó változások elektrofiziológiai vizsgálata, valamint a dendrittüskék kvantitatív és morfológiai analízise lehetőséget biztosít az ischémiás károsodások detektálására, valamint az esetlegesen protektív farmakonok hatásának tesztelésére.

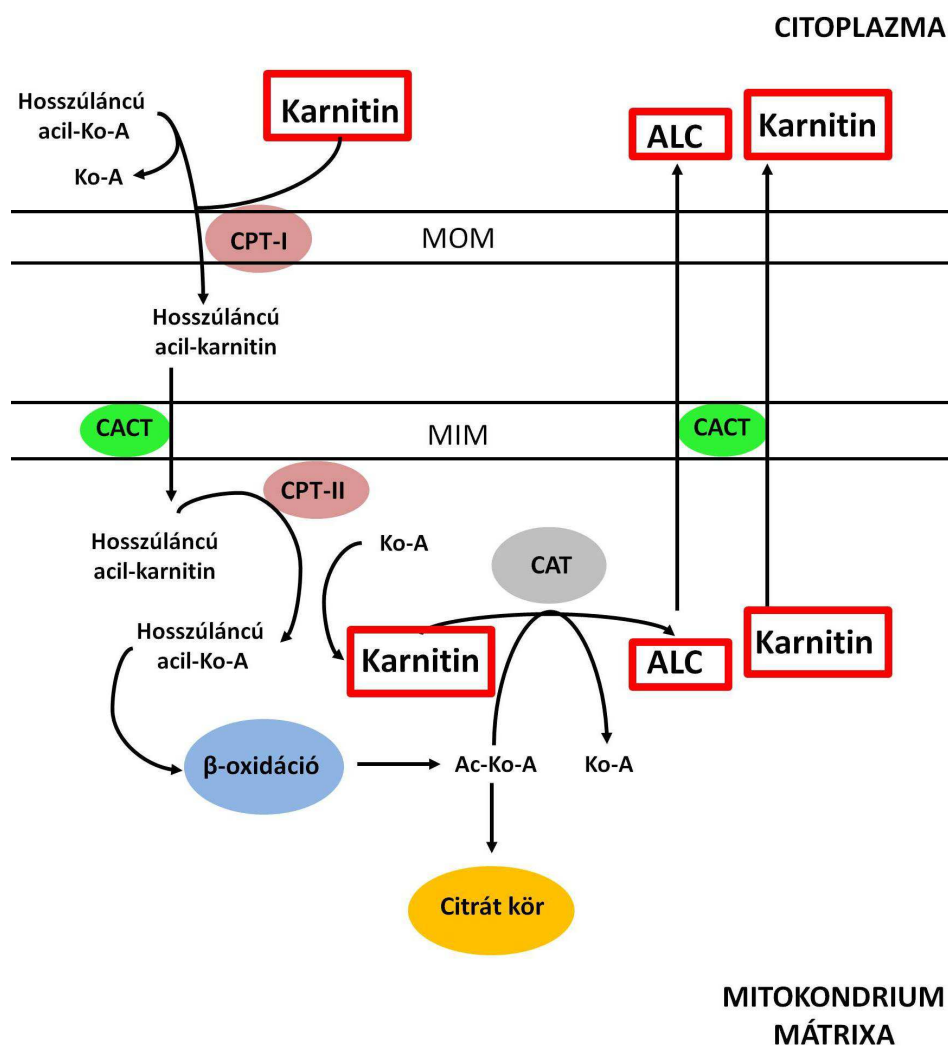
A karnitinek előfordulása és szerepe a szervezetünkben

A biokémia területén a karnitin története egészen az 1900-as évek elejére nyúlik vissza. Erről, az emlős szervezetben általánosan előforduló, endogén molekuláról először azt gondolták, hogy esszenciális vitamin, de később leírták, hogy a szervezet maga is képes az előállítására. Kémiai szerkezetét 1927-ben írták le (6. ábra).



6. ábra: Az L-karnitin kémiai szerkezete (Jones és mtsai., 2010 nyomán).

Ma már tudjuk, hogy a karnitin egy nem-esszenciális tápanyag, melynek legismertebb funkciója a hosszúlánú zsírsavak mitokondriumokba történő transzportálása a β -oxidációhoz (7. ábra). Általános jelenléte az összes állat-, valamint számos növény fajban és mikroorganizmusban (French és Fraenkel, 1954; Mitchell, 1978; Panter és Mudd, 1969), továbbá kísérő enzimeinek általános előfordulása arra enged következtetni, hogy filogenetikailag igen korán létrejött, feltehetőleg a mitokondriumok kialakulását követő rövid időn belül (Bremer, 1983). A lipidmetabolizmus során nem csak a zsírsavak belső mitokondriális membránon keresztül történő bejuttatásában van fontos szerepe, hanem a β -oxidáció során keletkezett két szénatomos fragmentek egy részének a citoplazmába való kijuttatásában is. Ezek az acetil-csoportok pedig különböző bioszintézis útvonalakban hasznosulnak majd a későbbiek során. Mivel az L-karnitin direkt és indirekt módon egyaránt érintett számos metabolikus útvonalban, így elérhetősége egy fontos tényező nem csak a zsírsavak és ketontestek, hanem a glükóz és az aminosavak oxidatív felhasználása szempontjából is (Virmani és Binienda, 2004).



7. ábra: A karnitin szerepe a sejt általános energia metabolismusában. Fiziológias körülmények között a CPT katalizálja az acil csoportok acil-Ko-A-ról karnitinre történő transzferjét, melynek eredményeként acilkarnitin és szabad KoA jön létre. Ez a zsírsavmetabolizmus egyik első, leginkább szabályozott lépése. A létrejött karnitinszter a belső mitokondriális membránon a CACT segítségével jut át. A mitokondrium mátrixába kerülve az acil csoportok Ko-A-ra kerülnek és belépnek a β -oxidációba. A szabaddá vált karnitin a CACT segítségével elhagyhatja a mitokondriumot, vagy a CAT által katalizált reakcióban acetilálódva ALC-vé alakulhat. Rövidítések: CPT – karnitin-palmitoiltranszferáz, CACT – karnitin-acilkarnitin-transzlokáz, CAT – karnitin acetiltranszferáz, Ko-A – Koenzim A, Ac-Ko-A – acetil-Koenzim A, ALC – acetil-L-karnitin, MOM – külső mitokondriális membrán, MIM – belső mitokondriális membrán (Jones és mtsai, 2010 nyomán módosítva).

Az emberi szervezet számára a karnitinek elsődlegesen a táplálkozás során válnak elérhetővé, főként húsokból és tejtermékekből. Ez a karnitinek mintegy 75%-át fedezi, bár a főzés során bekövetkező veszteség miatt csak néhány adat ismert az étrend teljes karnitintartalmára vonatkozóan. A fennmaradó 25%-ot az endogén, *in vivo* szintézis teszi ki, mely

során a molekula L-lizinből és L-metioninből képződik, elsősorban a májban és a vesében (Bieber, 1988; Borum, 1983). Az emberi váz- és szívizomszövet, máj, vese és agy képes a karnitin prekursorának, a γ -butirobetainnak az előállítására, azonban ezt a szubsztrátot kizárólag a máj, a vese és az agy képes tovább alakítani karnitinné (Rebouche és Engel, 1980). A reakciót a γ -butirobetain-hidroxiláz végzi. Magzatokban és újszülöttekben ez az enzim nagyon alacsony aktivitást mutat, ezért számukra esszenciális vitamin a karnitin, melyhez a placentán keresztül, illetve anyatej útján jutnak hozzá. Ugyanezen okból mind a szőja alapú, mind pedig a tehéntej alapú tápszerek tartalmaznak karnitint (Schmidt-Sommerfeld és Penn, 1990).

Az L-karnitin (trimetilamino- β -hidroxibutirát) a felvételt, illetve a szintézist követően a véráram útján jut el testünk különböző szöveteibe – májba, vesébe, a váz- és szívizomszövetbe, neuronokba, endomális szövetbe –, ahol a felvétele carrier-mediált transzportrendszerek segítségével valósul meg. Mindez lehetővé teszi a magas szövet/plazma koncentráció arány létrejöttét (Virmani és mtsai., 1996). Az L-karnitin a szövetekben beépül a szervezet karnitin raktárába, mint ikerionos formájú szabad karnitin, acetil-L-karnitin (ALC) vagy egyéb acilkarnitin. Az L-karnitint poláros tulajdonsága rendkívül mobilissá teszi, mindemellett a szabad hidroxil csoportja révén különböző karbonsavakkal képes észtereket alkotni, és így a szervezet különböző pontjaira transzportálni azokat (Jones és mtsai., 2010). Fiziológias körülmények között a különböző karnitin-aciltranszferázok katalizálják az acil-Koenzim A (acil-Ko-A) acil csoportjának karnitinre kerülését, melynek eredményeképpen acilkarnitin és szabad Koenzim A (Ko-A) képződik (Ramsay és Zammit, 2004). Az enzimcsaládon belül a karnitin-acetiltranszferáz (CAT) segíti az acetil csoportok karnitinre kerülését, míg az úgynevezett karnitin-palmitoil-transzferáz (CPT) az egyéb, hosszúláncú acilcsoportok karnitinésztereinek képződését katalizálja. Miután a külső mitokondriális membránban található CPT-I segítségével az acil csoport a karnitinre került a karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CACT) átjuttatja a molekulát a belső mitokondriális membránra. Ezt követően az itt található CPT-II az acil csoportot szabad Ko-A-ra helyezi. Ezáltal a karnitin is szabaddá válik, és elhagyhatja a mitokondriumot a CACT-n keresztül (7. ábra). ALC esetében ezt a reakciót a CAT enzim katalizálja.

A plazmából a neuronokba az L-karnitin Na^+ -és energiaszükségű módon jut el (Virmani és mtsai., 1994; Wawrzenczyk és mtsai., 2001), melyben feltehetőleg az OCTN2 szerves kation/karnitin transzporter vesz részt elsősorban (Wu és mtsai., 1999). Az agyban jelen van a

karnitin szintéziséért felelős enzim (Rebouche és Engel, 1980), és a molekula acilkarnitinekké történő átalakulását katalizáló karnitin-aciltranszferázok (CAT és CPT) is (Bird és mtsai., 1985). A CAT szintje a hippocampusban, a colliculusokban, valamint a bazális ganglionokban magas, míg CPT szintje a hipotalamusz területén a legmagasabb. Felnőtt agyból izolált neuronokban az összes karnitin mintegy 80%-át a szabad karnitinek teszik ki, kisebb hányadban pedig acil-karnitinek formájában van jelen. Ez utóbbi kb. 10-15%-át az ALC teszi ki (Jones és mtsai., 2010). Mivel a karnitin akár az aktivált acetát csoporttal, akár egyéb aktivált karbonsavakkal (különböző lánchosszúságú zsírsavakkal) egyaránt képes észtereket alkotni, így a számos lehetőség más és más kémiai és metabolikus tulajdonsággal rendelkező molekulákat eredményez. Például, amíg a hosszúláncú palmitoil-L-karnitin (PLC) méretéből adódóan nehezebben transzportálható, és ezért szerepe is korlátozódik, addig a rövidláncú ALC sokkal mobilisebb, mely nagy mértékben hozzájárul az acetil csoportoknak a szervezet különböző pontjaira történő eljuttatásához. Az egyes acilkarnitinek hatást gyakorolnak specifikus metabolikus útvonalakra, így az arányukban bekövetkező változások és a pontos acilkarnitin profil ismeretében különböző degeneratív elváltozásokra következtethetünk, melyek akár újszülött korban, akár felnőtt korban is felszínre kerülhetnek (Cavedon és mtsai., 2005; Clague és Thomas, 2002; Meyburg és mtsai., 2001). A veleszületett metabolikus zavarok toxikus anyagcseretermékek képződéséhez vezethetnek, melyek súlyos egészségügyi problémákat idéznek elő az élet korai szakaszán, vagy akár végzetes kimenetelűek is lehetnek. Ezért az újszülötteknél a korai, teljes körű karnitin-profil vizsgálat segít kiszűrni a rendellenességeket, és megelőzni, illetve elkerülni a későbbi súlyos fizikai és neurológiai következményeket (Clague és Thomas, 2002). Mivel a különböző bioenergetikai folyamatok kulcsszereplői a karnitinek, ezért a metabolikus egyensúly felborulásával összefüggő, főként mitokondriális diszfunkcióhoz köthető betegségek esetén fontos szereppel bírnak. A funkcionális karnitin iránti igény és az aktuálisan meglévő karnitin szint közötti egyensúly szabja meg, hogy a karnitin hiány klinikai tünetek formájában is felszínre kerül-e. Karnitin hiány esetén súlyos elégtelenségek lépnek fel a központi idegrendszerben. Az elsődleges karnitin hiány mögött a szervezetben zajló, természetes bioszintézis csökkenése vagy a sejtmembránokon keresztül zajló transzport megváltozása húzódik. Szisztémás formáját a hepatikus encefalopátia visszatérő epizódjai jellemzik a kisgyermekkor korai szakaszán (Brenningstall, 1990). Ez az állapot gyakran együtt jár hipoglikémiával és hipoketonémiával, de egyéb szimptómák is kísérhetik. Ezek között

említhetjük a hipotóniát, gyengeséget, kómás epizódokat, rohamokat, neuropátiát, bélcsatornát érintő problémákat vagy az anémiát. Az agyban primer karnitin hiány esetén főként az asztrociták citoplazmájának duzzadása, az idegsejtekben a mitokondriumok megnagyobbodása, valamint a fehérállományban a mielinhüvely hasadása figyelhető meg (Kimura és Amemiya, 1990). A karnitin pótlás gyorsan enyhíti a hiányos állapot jeleit, tüneteit (Brenningstall, 1990). Hasonló tünetek jelentkeznek másodlagos karnitin hiány esetén is, mely a táplálkozással kapcsolatos elégtelen karnitin bevitel vagy az abnormális karnitin vesztéssel vagy túlzott mértékű felhasználással kapcsolatos állapotok miatt alakul ki (Kerner és Hoppel, 1998). Ennek hátterében állhatnak genetikailag meghatározott β -oxidációs elváltozások, aminosav rendellenességek, szerzett egészségügyi károsodások (cirrózis és egyéb metabolikus zavarok). Mindemellett a másodlagos karnitin hiány felléphet kismamáknál és szoptató édesanyáknál is, valamint olyan esetekben, amikor az étrendből hiányzik a karnitin, pl. vegetáriánus diéta során, vagy bármely olyan állapotban, amely túlzott karnitin vesztéssel jár (pl.: vérátömlesztés vagy veseelégtelenség) (Virmani és Binienda, 2004). A másodlagos karnitin hiánnyal kapcsolatban számos szindrómát leírtak, melyeket az intermediér metabolizmusban bekövetkezett zavarok, ezen belül pedig elsődlegesen a mitokondriális oxidatív útvonalakban létrejött változások eredményeznek. Az ilyen eseteknél gyakran előfordul a kóma, mely a zsírsavak vagy zsírsav intermedierek direkt toxikus hatására jelentkezik (Stanley, 1987). A toxikus anyagok a májban felhalmozódnak, funkcionális zavart és ezáltal energiahiányt okoznak, továbbá a keringés révén egyéb szövetekbe, pl. az agyba is eljutnak, ahol a neuronokat és az idegszövet egyéb sejtjeit közvetlenül érinti a kóros állapot. A neuronokra negatív hatást elsődlegesen az energiahiány, valamint a véráram által érkező toxikus intermedierek gyakorolnak, míg az asztrocitákat főként a β -oxidáció zavara érinti. Az L-karnitin képes lehet enyhíteni a születési rendellenesség kapcsán metabolikus zavarokkal rendelkező páciensek tüneteit, melyek a toxikus szerves savak felhalmozódása miatt alakultak ki. Az autointoxikáció ezeknél a betegeknél az intermediér metabolizmust megszakító acil-Ko-A vegyületek felhalmozódásának köszönhető. Az acil-Ko-A vegyületek ezt követő hidrolízise – szabad savjukra – acidózist eredményezhet, amely akár halálos kimenetelű is lehet. Az L-karnitin az acil-Ko-A-kat eltávolítja azáltal, hogy acil-karnitineket hoz létre, mely ezt követően könnyen kiürül a szervezetből (Virmani és Binienda, 2004).

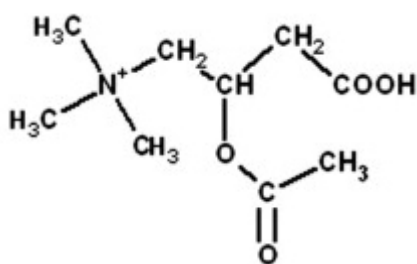
A karnitin elégtelenség nyomán kialakuló patológiás körülményekben, a karnitin alkalmazását célzó kísérletekben a hatóanyag számos fontos biokémiai és fiziológiai szerepe

egyaránt kimutatható. A már említett β -oxidációban betöltött funkciója mellett fontos megemlíteni, hogy a karnitin szabályozza a ketontestek termelődését, valamint befolyásolja az aminosav és a szénhidrát metabolizmust is (Virmani és Binienda, 2004). Ez utóbbiban fontos szerepe van annak, hogy képes aktiválni a piruvát-dehidrogenázt (PDH) (Hulsmann, 1991), feltehetően az acetil-Koenzim A (Ac-Ko-A)/Ko-A arány csökkentésével.

A karnitin több olyan anyagcsere útvonalban is részt vesz, amelyek sérülését különböző betegségekben, köztük neurodegeneratív elváltozásokban is megfigyelték. Ennek kapcsán az elmúlt évtizedekben felmerült a karnitinek protektív hatóanyagként való alkalmazása. E kérdés kísérletes vizsgálatában központi figyelmet kaptak azok a kórképek, melyek kialakulásának hátterében a mitokondriumok zavart működése, és az ezzel összefüggésben lévő energiahiány és oxidatív stressz áll (pl. Alzheimer-kór, Huntington-kór, ischemia). A különböző karnitin származékok közül a rövidláncú ALC az egyik legígéretesebb molekula, melynek protektív hatását preklinikai és klinikai vizsgálatok is igazolják. Ezekre részletesebb kitekintést a disszertációm későbbi fejezetében teszek.

Az acetil-L-karnitin jellemzői és legfontosabb szerepei

Az ALC a szervezet legszélesebb körben jelenlévő rövidláncú karnitin észtere (8. ábra), mely csakúgy, mint az L-karnitin, viszonylag magas koncentrációban van jelen az agyban (Shug és mtsai., 1982).

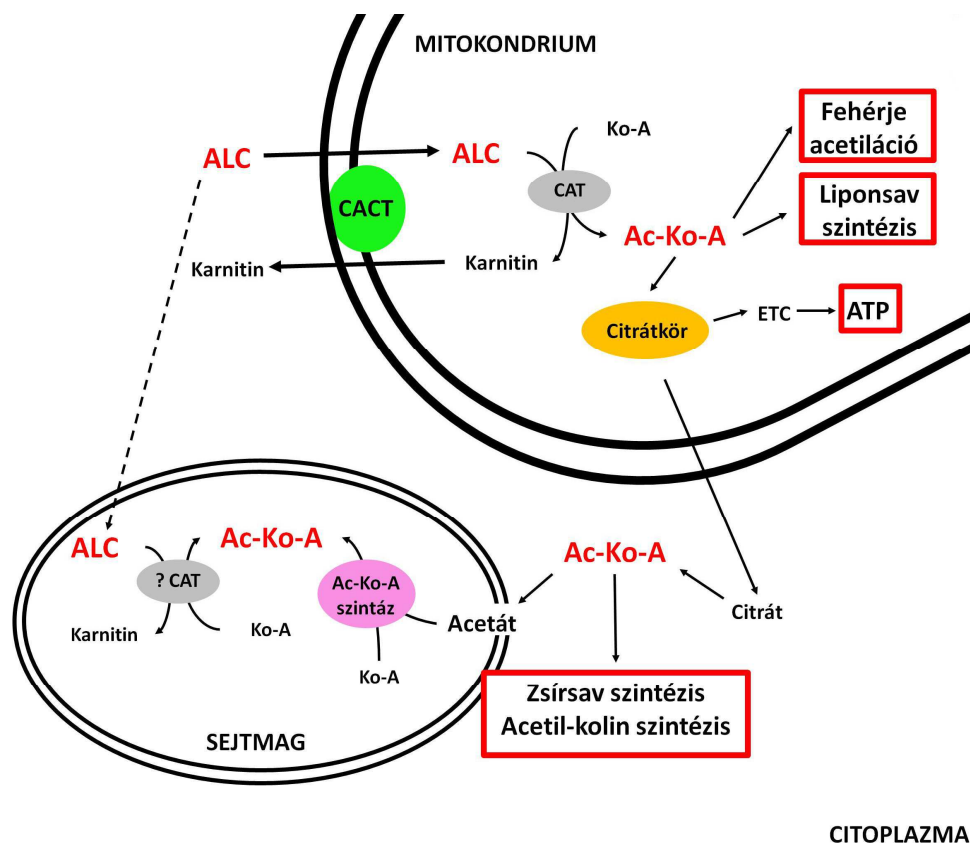


8. ábra: Az ALC kémiai szerkezete (Jones és mtsai., 2010 nyomán).

Szintje a hipotalamusz területén kifejezetten magas (Bresolin és mtsai., 1982). Az ALC/szabad karnitin arány az agyban a legmagasabb, ezzel szemben a szívben és a vesében jóval kisebb érték jellemző (Borum, 1983). A piruvátból, aminosavakból, zsírsavakból

származó Ac-Ko-A karnitin jelenlétében reverzibilisen átalakul ALC-vé és Ko-A-vá a mitokondriumban található CAT által katalizált reakcióban, mely az agyban, májban és a vesében egyaránt lezajlik. Ez a folyamat regenerálja a szabad Ko-A-t, mely által a zsírsav oxidáció és a citrátkör zavartalanul működhet. Az ALC a belső mitokondriális membránban található karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CACT) segítségével transzportálódik a citoplazmába. A citoplazmába kijutott ALC acetyl csoportokat biztosít például szterolok, zsírsavak, valamint ketontestek szintéziséhez (Rosca és mtsai., 2009).

A szervezetbe történő ALC bevitt követően a molekula a CACT segítségével a mitokondriumba transzportálódik. A CAT enzim működésének eredményeképpen ALC-ből és szabad Ko-A-ból Ac-Ko-A és szabad karnitin képződik. A mitokondriumon belül acetátból *de novo* Ac-Ko-A szintézis is folyik. Az Ac-Ko-A több útvonalon is hasznosulhat. Részt vehet a mitokondriális fehérje acetilációban, a liponsav szintézisben, illetve a citrátkörbe lépve, az elektrontranszport lánc működése által végső soron az ATP termeléshez is hozzájárulhat. A citoszólikus Ac-Ko-A származhat a mitokondriumból kikerülő citromsavból, valamint a peroxisómális acetátból. Ez az Ac-Ko-A részt vehet itt is a zsírsavak szintézisében, acetilkolin előállításban, valamint direkt módon, vagy acetát formájában a sejtmagba transzlokálódhat, ez utóbbi az ott jelenlévő Ac-Ko-A szintáz által ismét Ac-Ko-A-vá alakul. Az Ac-Ko-A a sejtmagban a hiszton és nem-hiszton fehérjéket acetilálja, így génexpressziós változásokat hoz létre. Közvetlen bizonyítékok a sejtmagi CAT jelenlétére még nincsenek, de ha valóban van magi CAT, akkor az itt is a sejtmagba transzlokálódott ALC szabad karnitinné és Ac-Ko-A-vá történő átalakítását végzi szabad Ko-A segítségével (9. ábra, Rosca és mtsai., 2009).



9. ábra: Az ALC-ből származó Ac-Ko-A metabolikus jelentősége. Az Ac-Ko-A részt vehet a mitokondriális fehérjék acetilálásában, liponsav szintézisben, a citrátkörön keresztül az energiatermelésben, továbbá zsírsav és acetil-kolin szintézisben, vagy akár a génexpresszió szabályozásában is. Rövidítések: ALC – acetil-L-karnitin, CACT – karnitin-acilkarnitin-transzferáz, CAT – karnitin acetiltranszferáz, Ko-A – Koenzim A, Ac-Ko-A – acetil-Koenzim A, ETC – elektron transzport lánc (Rosca és mtsai., 2009 nyomán módosítva).

Bár a szervezetben jelenlévő karnitinek 99%-ban intracellulárisan lokalizáltak, a szérumban jelenlévő acilkarnitin/karnitin arány mégis rendkívül érzékeny az intramitokondriális változásokra. A teljes karnitin és az ALC koncentrációk felnőtt ember esetén rendre 23-73 μM -t és 3-14 μM -os értékek között mozognak a plazmában (Minkler és mtsai., 2008). Az ALC plazma koncentrációját és kiválasztását a fiziológiai és patológiai állapotok befolyásolják, amely főként az Ac-Ko-A szintézis mértékére enged következtetni. Normál esetben éhezés esetén a vizsgált alanyok ALC kiválasztása 78%-ra növekszik (Hoppel és Genuth, 1982). Ezzel szemben cukorbetegyeknél hasonló körülmények jóval lassabb és alacsonyabb szintű ALC kiválasztást eredményeznek, amely lassabb, zsír oxidáció általi Ac-Ko-A szintézisre utal. Azon diabeteses alanyoknál, akiknél ketózis is előfordul, a vizeletben jelenlévő összes acilkarnitin 61%-át az ALC teszi ki, amely drámai csökkenést mutat inzulin

kezelés hatására (Hoppel és Genuth, 1982). A szövetek ALC tartalma a mitokondriális CAT mennyiségétől függ. Mivel limitált mennyiségű mitokondriális CAT van jelen, ezért a májban az ALC transzport rendkívül korlátozott, és a májsejtek mitokondriumaiból a citoszólba az Ac-Ko-A egységek citrát formájában transzportálódnak (Rosca és mtsai., 2009).

Mivel az ALC – csakúgy, mint a karnitin – több metabolikus útvonal működését is befolyásolja, ezért az energiaháztartás felborulásával járó betegségekben fontos szerepe van (pl. ischemiás-reperfúziós sérülések, Alzheimer-kór, időskori demencia, stb.). Emellett egyedi neuroprotektív, neuromodulátoros és neurotrófikus tulajdonságuk révén szintén kapcsolatba hozhatók a különböző kórképekkel. Az ALC ígéretes terápiás alkalmazási lehetősége először azon alapult, hogy kisméretű molekula lévén könnyen átjut a BBB-n. A karnitinhez hasonlóan ez főként a nagy affinitású, Na^+ -függő szerves kation/karnitin transzporterén, az OCTN2-n keresztül valósul meg, illetve kisebb mértékben a $\text{B}^{(0,+)}$ aminosav transzporterek is részt vesznek a molekula agyba juttatásában (Inano és mtsai., 2003; Miecz és mtsai., 2008; Nalecz és mtsai., 2004). A közelmúltban azt is kimutatták, hogy a nagy affinitású OCTN2 és OCTN3 transzporterek mind asztrocitákon, mind neuronokon jelen vannak csecsemő és felnőtt agyban is (Januszewicz és mtsai., 2010; Januszewicz és mtsai., 2009).

Az orálisan adagolt ALC a bélcsatornából a véráramba kerül (Gross és mtsai., 1986), majd onnan gyorsan távozik a vese, bél, szív, agy és máj szövetébe. A bélhámsejtekbe történő felvétel közben vagy azt követően már deacetilálódik, majd az újonnan formálódott intracelluláris szabad karnitin egy része ismét acetilálódik (Rebouche, 2004). Az orálisan beadott ALC felszívódása igen gyenge, bár a szervezet nagy dózisban is jól tolerálja a hatóanyagot. Juguláris artériába történő injektálását követően a felvétel 15 másodperc alatt végbemegy (Kido és mtsai., 2001). Főemlősökön végzett pozitron emissziós tomográfus (PET) vizsgálattal kimutatták, hogy egyszeri ALC injektálást követően a molekula 5 percen belül eljut az agyba, és a kéregben még 60 perc elteltével is magas a koncentrációja (Kuratsune és mtsai., 1997). Az agy sejtjeiben az ALC CAT enzim segítségével Ac-Ko-A-vá és szabad karnitinné alakul ATP felhasználása nélkül (Ramsay és mtsai., 2001). Ezáltal az ALC az acetil csoportok raktáraként képes funkcionálni, melyek aztán számos útvonalon keresztül hasznosulhatnak, pl. lipidek, glikogén és acetil-kolin szintézisében (Dolezal és mtsai., 1981; Farrell és mtsai., 1986; Ricciolini és mtsai., 1998). Az ALC az oldalsó agykamrába injektálva CO_2 -vé alakul, és gyorsan beépül az agy telített, valamint egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavaiba (Ricciolini és mtsai., 1998). Számos tanulmányban

leírták, hogy az intravénásan beadott ALC képes modulálni az agyi metabolizmust. Ez a beadást követő 10-30 percen belül megnövekedett agyi glükóz metabolizmusához vezet (Ori és mtsai., 2002), és ischémiát követően csökkenti az agyi laktát szintjét (Rosenthal és mtsai., 1992; Zanelli és mtsai., 2005). Az ALC hatása mögött húzóódó lehetséges mechanizmusként jelölik meg a molekulának azt a tulajdonságát is, hogy Ac-Ko-A-t, mint oxidálható szubsztrátot képes biztosítani a citrátkör számára (Kuratsune és mtsai., 1997; Zanelli és mtsai., 2005). Az ALC a szervezetből elsősorban vizelettel ürül, mind karnitin, mind ALC formájában (Marzo és mtsai., 1989).

10. ábra: Az ALC protektív hatása mögött húzóódó lehetséges szignalizációs útvonalak. Az ALC-t „mitokondriális tápanyagforrásként” tartják számon, amely a jótékony hatásait számos módon képes kifejteni, melyek közös jellemvonása, hogy számukra acetil csoport forrást jelent az ALC (Rosca és mtsai., 2009 nyomán módosítva).

szabályozása vagy akár a kolinerg neurotranszmisszió elősegítése (10. ábra) (Rosca és mtsai., 2009; Virmani és Binienda, 2004; Zanelli és mtsai., 2005).

Kitekintés néhány ALC-vel kezelt neurodegeneratív elváltozásra

Az ALC-t az agy, a szív, illetve egyéb szervek metabolikus állapotának javítását célzó állatkísérletekben, illetve klinikai kezeléseknél sokkal szélesebb körben alkalmazzák, mint az L-karnitint, hiszen jobban felszívódik, és könnyebben átjut a BBB-n. Az ALC-nek különböző lehetséges hatásmechanizmusát leírták már, s ezek között az egyik legfontosabb a mitokondriális funkcióra gyakorolt hatása. Ennek kapcsán számos olyan betegségmodellen vizsgálták a hatóanyagot, melyek központi elemét a mitokondriumok sérülése, illetve az oxidatív stressz jelenti.

Az öregedéshez legnagyobb mértékben az oxidatív mitokondriális hanyatlás járul hozzá. Kimutatták, hogy normál mitokondriális metabolitok (pl. ALC) bevitelével mindez csökkenthető (Ames és Liu, 2004). Idős patkányoknál 3 hónapon át folyamatosan tartó ALC kezelés hatására megnőtt az acetil-kolin szintézis, a depolarizáció által kiváltott acetil-kolin felszabadulás, valamint az állatok hippocampális agyszeleteiben elektrofiziológiai vizsgálatokkal kimutatható volt a serkentő posztzinaptikus potenciálok (EPSP-k) meredekségének és a populációs spike-ok amplitúdójának növekedése. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy az ALC fokozza az agyban a szinaptikus neurotranszmissziót, és ezáltal elősegíti a tanulást az idős állatoknál (Kobayashi és mtsai., 2010). A leggyakoribb, demenciával járó időskori neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór (AD), ahol a memóriadeficit hátterében a tau fehérje hiperfoszforilációja, valamint a β -amiloid felhalmozódása áll. Patkányoknál az ALC hatását AD modellen vizsgálva kimutatták, hogy a kezelés csendesíti a tau fehérje hiperfoszforilációját, meggátolja a β -amiloid prekursor fehérje (APP) foszforilációját, ezáltal pedig csökken a β -amiloid mennyisége, aggregációja. Ezek nyomán a memóriadeficit visszaszorítható, tehát az ALC egy ígéretes jelölt lehet az AD patofiziológiás és viselkedésbeli elváltozásainak kezelésére (Zhou és mtsai., 2011).

A Huntington-kór (HD) az egyik legnagyobb gyakoriságú neurodegeneratív betegség, mely 100.000 emberből 4-5-öt érint. A leggyakoribb tünetei a motoros defecitek, a depresszióban manifesztálódó emocionális- és viselkedészavarok, kognitív károsodások, stb (Mehrotra és Sandhir, 2014). A betegség során megfigyelhető neuropatológiai elváltozások fő okozója a sérült mitokondriális működés nyomán fellépő ROS képződés (Ames és mtsai.,

1993). Ebből kifolyólag a HD elleni küzdelem elsődleges célpontjai azok az eljárások és hatóanyagok, melyek a mitokondriumok működésének fokozását, helyreállítását célozzák. Egy közelmúltban megjelent tanulmányban kimutatták, hogy a mitokondriális kofaktor ALC és α -liponsav együttes adása hatékonyan csökkentette az oxidatív stresszt, a kialakult hisztológiai elváltozásokat és a viselkedési deficiteket patkány HD modellben (Mehrotra és Sandhir, 2014).

Az alkoholizmusban kialakuló oxidatív stressz különböző neurodegeneratív elváltozásokat okoz, úgymint gyulladás, neuronális pusztulás, vagy asztrogliózis (Potula és mtsai., 2006; Riikonen és mtsai., 2002). Alkoholal itatott egerek frontális kortikális agyszeletében csökkent mértékű szinaptikus transzmissziót mutattak ki a kontroll csoporthoz képest. ALC kezelés hatására szignifikánsan csökkent az oxidatív károsodás és a neuronális pusztulás, valamint megfigyelték a szinaptikus neurotranszmisszió helyreállítását is. Ez arra enged következtetni, hogy az ALC képes megvédeni az agyszövet sejtjeit az alkohol-indukálta oxidatív sérüléstől (Rump és mtsai., 2010).

Az ALC depresszió kezelésében való alkalmazására is már nagyszámú szakirodalmi publikáció látott napvilágot. A major depresszió (MDD) egy általános, normális életvitelt ellehetetlenítő betegség, mely enyhébb és súlyosabb formákat egyaránt ölthet. Annak ellenére, hogy számos, különböző hatásmechanizmussal rendelkező antidepresszáns elérhető (főként a monoaminerg rendszert célzó), a páciensek jelentős hányadánál a kezelés nem hozza meg a várt eredményt (Bauer és mtsai., 2013). A neuroplaszticitásban megfigyelhető elváltozások az MDD esetén is központi patofiziológiai mechanizmusként szerepelnek (Pittenger és Duman, 2008). Depressziós betegeknél a neuroplaszticitásban fontos szerepet játszó zsírsav- és lipidmetabolizmus megváltozik (Peet és mtsai., 1998), így érthető az ALC esetleges protektív hatásának vizsgálata MDD esetén is. Wang és munkatársai egy közelmúltban megjelent tanulmányukban nagyszámú olyan publikáció eredményét foglalták össze, melyekben arról számoltak be, hogy az ALC depresszióban protektív hatást fejtett ki (Wang és mtsai., 2014). Mindez számos aspektusból megközelíthető és magyarázható. Egyrészt a molekula az idegi plaszticitást képes befolyásolni, pl. a különböző neurotrófikus faktorok, úgymint BDNF, ARTN vagy NGF upregulációja által (Di Cesare Mannelli és mtsai., 2011). Az MDD-ben központi szerepet játszó, lipidmetabolizmusban bekövetkező változást az ALC képes kivédeni azáltal, hogy befolyásolja a membrán foszfolipid metabolizmusát és a membrán fiziko-kémiai tulajdonságait (Pettegrew és mtsai., 2000). Mindemellett a neurotransmitter rendszerek

modulálásában is részt vesz, pl. a depresszió kezelése szempontjából fontos szerotoninerg és dopaminerg rendszerre is hatást gyakorol. Kimutatták, hogy a mezokortikolimbikus területeken az ALC képes elősegíteni a szerotonin és a dopamin felszabadulását (Tolu és mtsai., 2002).

A hipoxiás-ischemiás (HI) károsodások a perinatális periódusban 1000-ból megközelítőleg 1-6 csecsemőt érintenek (Shankaran, 2009). Mindez végzetes kimenetelű is lehet, a túlélők esetében pedig sérült idegi fejlődést, tanulási nehézségeket vagy mentális retardációt okozhatnak. Épp ezért rendkívül intenzív mértékben folynak kutatások a HI által okozott agykárosodás mértékének csökkentésére, kivédésére (Cerio és mtsai., 2013). Xu és munkatársai 7 napos patkányokon előidézett HI-vel szemben alkalmazott ALC kezelés hatását vizsgálták. Tanulmányukból kiderül, hogy a hatóanyag HI-t követő korai alkalmazása esetén neuroprotektívnek bizonyult a súlyos oxidatív és ozmotikus stresszel, a sérült foszforilációval és az anaerob glikolízissel szemben, ugyanis energia szubsztrátként szolgálva elősegítette az agyi oxidatív energiatermelést és minimalizálta az anaerob glikolízist (Xu és mtsai., 2014).

A traumás gerincvelői sérülések hosszan fennálló gyulladásos választ indukálnak, amely a gerincvelői neuronok és gliális elemek apoptotikus pusztulásához vezet. Az ALC-vel történő kezelés késlelteti a hátsógyöki ganglion érző neuronjainak degenerálódását perifériás ideg sérülését követően (Hart és mtsai., 2002). Karalija és munkatársai kimutatták, hogy az ALC képes csökkenteni a motoneuronok degenerálódását a lumbális gerincvelői sérülés után, továbbá csökkenti a mikroglia- és makrofág aktivációt, és axonnövekedést vált ki a sérült szegmentumban (Karalija és mtsai., 2012). A kutatócsoport munkáit tovább folytatva, az ALC hosszútávú hatását is vizsgálta. Ezen kísérletek is igazolták a molekula neuroprotektív tulajdonságát, hiszen a gerincvelői sérülést követően anti-apoptotikus, gyulladásgátló és proregeneratív hatása ekkor is kimutatható volt (Karalija és mtsai., 2014).

A fejlődő és a felnőtt agy traumás sérülése során az energia metabolismus perceken belül felborul, ami aztán órákon keresztül fennáll, majd ezt követően a sejtpusztulás folyamata is elindul (Robertson és mtsai., 2009). A sérülést követően több mitokondriális enzim oxidatív módosulása és inaktiválódása is megfigyelhető, ezek között említhető a PDH is. Mivel a PDH által katalizált reakció közvetlen hidat biztosít a glikolízis és a citrátkör között, ha ez sérül az aerob metabolismus megszakad. Egy olyan alternatív energiaforrás, amely ezen reakcióhoz képest disztálisan helyezkedik el, képes lehet áthidalni ezt a lépést. Ilyen molekulák pl. a ketontestek, zsírsavak és az acilkarnitinek, melyek az eredetileg PHD

által katalizált reakció termékévé, vagyis Ac-Ko-A-vá metabolizálódva a citrátkörbe léphetnek (Zanelli és mtsai., 2005). Az ALC ezen tulajdonságának köszönhetően patkányoknál a traumás agysérülést követő első 24 órán belül alkalmazva képes volt az agyi lézió mértékét csökkenteni, valamint a magatartásbeli kimenetelt javítani (Scafidi és mtsai., 2010).

Számos, idegszöveti elváltozáshoz köthető patológias állapotot jellemez az úgynevezett neuropátiás fájdalom, amely egy perifériás vagy központi idegrendszeri sérüléssel vagy károsodással kapcsolatban kialakuló hibás szignalizáció. Látható sérülés vagy klinikailag vizsgálható gyulladás hiányában is fennállhat. Patofiziológiai mechanizmusai mitokondriális diszfunkcióhoz köthetők, amely végső soron az apoptotikus kaszkád aktivációjához vezet. Perifériás neuropátiás modellben kimutatták, hogy az ALC kezelés képes a hiperalgéziát az apoptózist csökkenteni (Di Cesare Mannelli és mtsai., 2009).

Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munkám célja egy olyan hatóanyag ischemiás modelleken való tesztelése volt, amelynek egyik legfontosabb előnyös tulajdonsága, hogy a szervezetben endogén módon is jelen van, ezért mellékhatással nem kell számolni, és a dózírozási nehézségek is elkerülhetőek. Méréseink három kísérletsorozat köré csoportosultak.

- 1.) Az ALC esetleges protektív hatásának vizsgálata 2VO által okozott károsodásokkal szemben, melyhez elektrofiziológiai (LTP) és hisztológiai méréseket végeztünk.**
- 2.) Az ALC hatásának elektrofiziológiai módszerekkel történő vizsgálata *in vitro* globális ischemiával szemben, valamint annak tesztelése, hogy a hatóanyag képes-e olyan mértékű funkcionális regenerációt előidézni, amely stabil LTP-ben is megnyilvánul.**
- 3.) A kísérletek során tapasztalt neuroprotektív hatás hátterében húzódó lehetséges szignalizációs útvonal feltérképezése. Kérdés volt számunkra, hogy a PI3K/Akt útvonal részt vesz-e az ALC hatásmechanizmusában?**

Az első kísérletsorozatban elektrofiziológiai módszerek alkalmazásával arra kerestük a választ, hogy a 2VO milyen mértékű funkcionális romlást eredményez a műtétet követően 5 nappal később, illetve ezen modellen vizsgáltuk az ALC potenciális neuroprotektív hatását. Mivel a szakirodalomban fellelhető adatok túlnyomó többsége azt mutatja, hogy az ALC csak előkezelésben alkalmazva hatékony az egyes neurodegeneratív betegségekkel szemben, ezért célul tűztük ki, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben is összevetjük az elő- és utókezelésben mutatott hatását. Az elektrofiziológiai vizsgálatok mellett ezen kísérletsorozat szerves részét képezte az egyes vizsgálati csoportok hisztológiai analízise, mely során a szinaptikus plaszticitás mértéke és a dendrittüskék száma közötti összefüggés meghatározása volt a célunk.

A második kísérletsorozat előkísérleteiben célunk volt egy *in vitro* globális ischemiás (OGD) rendszer felállítása, és az ehhez szükséges paraméterek meghatározása annak érdekében, hogy a további kísérletekben ezen modell alkalmazásával is vizsgálni tudjuk az ALC-t. Ehhez

szükséges volt a megfelelő OGD-s időablak intervallumának pontos meghatározása. A megfelelő időtartamú ischemiás inzultus megválasztását követően nyílt lehetőségünk a második kísérletsorozat elsődleges céljául kitűzött ALC hatásvizsgálatra. Ennek keretein belül szükséges volt annak a legkisebb effektív dózisnak a meghatározása, amely alkalmazásával a sejtpusztulás, a szinaptikus transzmisszió megszakadása, valamint szinaptikus plaszticitás sérülése is kivédhető.

A harmadik kísérletsorozatban arra irányultak vizsgálataink, hogy meghatározzuk az ALC protektív hatása mögött húzódó háttérmechanizmusokat, melyek mind a 2VO-s, mind pedig az OGD modellben kapott eredmények mögött egyaránt húzódnak.

Anyagok és módszerek

A kísérletek során felhasznált állatok

Kísérleteink során fiatal felnőtt (200-250 g-os), hím Wistar patkányokat alkalmaztunk (N=74). Az állatokat a kísérlet megkezdéséig az SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékének állatházában szabványos műanyag ketrecekben tartottunk, ahol 12-12 órás világos-sötét periódust, standard 23°C hőmérsékletet, továbbá a vízhez és az élelemhez való szabad hozzáférést biztosítottunk. A kísérletek során arra törekedtünk, hogy minimális számú állatot használjunk fel, valamint, hogy a legkisebb mértékű szenvedést okozzuk számukra. Minden esetben követtük a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állat gondozással kapcsolatos protokollt (1998) és az Európai Községek Tanácsának 1986. november 24-i rendeletét (86/609/EEC). Az első kísérletsorozatban, ahol az ischémiás inzultust a 2VO műtéttel idéztük elő, 37 db állatot használtunk fel. Az elemszámok az első kísérletsorozat elektrofiziológiai vizsgálataiban csoportokra lebontva a következőképpen alakultak: álműtött kontroll N=6; 2VO-s csoport N=6; 2VO+ALC előkezelt (100 mg/kg) N=5; 2VO+ALC utókezelt (100 mg/kg) N=5; 2VO+ALC utókezelt (200 mg/kg) N=6; ALC előkezelt (100 mg/kg) álműtött N=3; ALC utókezelt (100 mg/kg) álműtött N=3; ALC utókezelt (200 mg/kg) álműtött N=3. A Golgi-Cox impregnációs hisztológiai vizsgálatokhoz 16, az OGD-s kísérletsorozatokban pedig 21 állatot használtunk fel.

A két-ér elzárásos (2VO) modell

A 2VO műtéti technikával egy olyan globális hipoperfúziós állapot idézhető elő, amely jól modellezi például az időskori krónikus csökkent agyi vérátáramlást, amely például a carotis artériák elmeszesedése nyomán alakulhat ki. A 2VO elvégzéséhez az állatokat nátrium-pentobarbital oldat (60 mg/ml) intraperitoneális (i. p.) injekálásával altattuk. A műtétet csak azután kezdtük, amikor megbizonyosodtunk arról, hogy az állat már mélyen alszik, és nem érez semmilyen fájdalmat. A preparálás megkezdése előtt a nyak területén a szőrt eltávolítottuk, ezt követően bemetszést ejtettünk a bőrön, ahol lokális fájdalomcsillapításra Lidocain (Sigma, Németország) oldatot (100 mg/ml) alkalmaztunk. Óvatos mozdulatokkal a kötőszövetes részekről és a nyaki izmokról szabaddá tettük az arteria carotis communisokat (cca). A feltárt artériákról eltávolítottuk a vagoszimpatikus idegköteget,

az erek alatt cérnát fűztünk át, hogy megkönnyítsük az aneurizma csipeszek felhelyezését. Ezt követően a sérülést nem okozó csipeszek segítségével 30 percre reverzibilisen elzártuk az cca-kat. Az állatok testhőmérsékletét a műtét alatt, illetve azt követően az ébredésig folyamatosan monitoroztuk, és egy automata melegítőpad (Supertech TMP-5a, Hungary) segítségével 37 ± 0.5 °C között tartottuk. A 30 perces periódus elteltével az aneurizma csipeszeket eltávolítottuk, ezáltal a keringés helyreállhatott. Az esetleges fertőzések elkerülése érdekében a feltárt területen antibiotikumot alkalmaztunk, majd sebészi cérnával zártuk és Betadinnal fertőtlenítettük a sebet. A varrt seb területén fájdalomcsillapításhoz szintén Lidocain oldatot használtunk. A műtétet követően 5 napos túlélési időt választottunk, majd ezt követően végeztük az elektrofiziológiai és hisztológiai vizsgálatainkat.

Az első kísérletsorozat csoportjai, kezelések acetil-L-karnitinnel

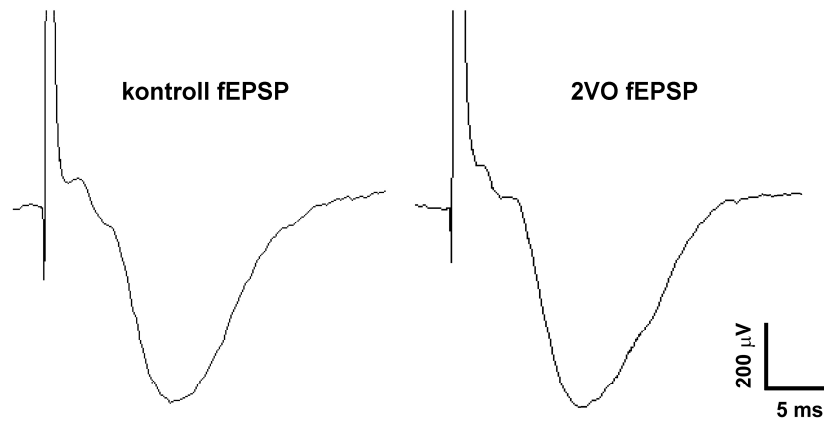
Kísérleteink első részében az ALC-nek (Sigma, Németország) a globális hipoperfúzióval szemben gyakorolt hatását vizsgáltuk az LTP indukálhatóságán keresztül. A hatóanyagot 1 ml fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, majd az állatok szervezetébe napi egyszeri i.p. injekció formájában juttattuk be. Az előkezelt csoport az ALC-t 100 mg/kg-os dózisban kapta, a 2VO műtétet megelőzően, 5 napon keresztül. Két utókezelt csoporttal dolgoztunk kísérleteink során: az egyik csoportban az állatok az alacsonyabb, 100 mg/kg-os dózisú ALC kezelést kapták, míg a másik csoportban szereplők egy magasabb, 200 mg/kg-os dózist. Az utókezeléseket minden esetben a 2VO-t követően 5 napon át végeztük (az első kezelést a műtét követően 1 órával kapták a patkányok). Mindemellett elő- és utókezelt álműtött csoportokban is megvizsgáltuk, hogy az ALC okoz-e változást a szinaptikus transzmisszió tartós megnövekedésében.

***In vitro* elektrofiziológia**

Az elektrofiziológiai mérésekhez az állatokat dekapitáltuk, majd a fejbőrt és az alatta elhelyezkedő kötőszövetet bemetszve szabaddá tettük a koponyát. Ezt követően a sutura saggitális mentén egy hosszanti, a sutura coronalis mentén, valamint ettől caudálisan jobb és bal irányban egy-egy keresztirányú metszést ejtettünk. A koponyatető szétnyitását követően a bulbusok mögött és a kisagy előtt coronalis metszéseket végeztünk, ez lehetővé tette hippocampust tartalmazó, kb. 3 mm vastagságú agyi régió eltávolítását. A hippocampus középső részéből vibratóm (Leica VT1200S, Németország) segítségével 350 µm vastagságú

szeleteket készítettünk. A metszést mesterséges cerebrospinális (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) folyadékban végeztük, melynek hőmérséklete maximum 4 °C volt. Az aCSF összetétele: 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 1 mM CaCl₂, 3 mM MgSO₄ és 10 mM D-glükóz (Sigma, Németország). A lemetezett szeleteket szobahőmérsékletű regisztráló aCSF-be helyeztük, melynek összetétele csak a 3 mM CaCl₂ és 1.5 mM MgSO₄ koncentrációkban tért el a metszésnél használttól. A metsző és a regisztráló aCSF-et egyaránt karbogénnel (95% O₂, 5% CO₂) oxigenáltattuk, ezáltal biztosítva a szeletek megfelelő és zavartalan O₂ ellátását. Az összes hippocampális szelet elkészítését követően a szelettartó edényben lévő regisztráló aCSF-et 34-35 °C -ig melegítettük, és az agyszeleteket minimum fél órán át ilyen körülmények között pihentettük annak érdekében, hogy a szeletkészítés során okozott sérülésekkel szemben megkezdődött regenerációs folyamatok végbemehessenek. Ezt követően megkezdtük a folyadék hűtését, és az agyszeleteket a kísérletek megkezdéséig állandó 16-18 °C -os hőmérsékleten tartottuk. A mérésekhez Haas-típusú regisztráló kamrába helyeztük a szeleteket, ahol 34 °C -on, páradús környezetben, regisztráló aCSF perfúziója mellett kb. fél órán keresztül pihentettük őket a kísérlet megkezdéséig. A kamrában a perfúziós aCSF áramlási sebessége ~ 2 ml/perc érték közötti volt.

Az elektrofiziológiai felvételekhez egy koncentrikus, rozsdamentes acél elektródot (Neuron elektród kft; Budapest, Magyarország) helyeztünk a hippocampus CA3-CA1-es régiója között a stratum radiatum rétegbe, ahol az ingerlést állandó áramerősség mellett, 0.2 ms-os impulzusokkal 0.033 Hz frekvencián végeztük. Az aCSF-fel feltöltött, 2-3 MΩ ellenállású regisztráló elektródokat ettől orthodróóm helyzetben pozícionálva, a CA1-es régió stratum radiatum rétegéből serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálokat (fEPSP) vezettünk el (11. ábra). A CA3 felől érkező Schaffer-kollaterálisok a CA1-es piramissejtek apikális dendritjein szinaptizálnak, ahol az ingerlés hatására EPSP-ket hoznak létre. A hippocampus jellegzetes citoarchitektúrájának köszönhetően ezek az áramok összegződnek, létrehozva a fEPSP-ket, melyeket megfelelő ellenállású elektródák segítségével regisztrálni tudunk.



11. ábra: Az elektrofiziológiai mérések során regisztrált, reprezentatív fEPSP-k a kontroll és a 2VO-s csoport esetén. Jól látható, hogy a globális hipoperfúzió – ugyan funkcionális károsodást okoz – nem eredményez patológiás elváltozást (pl. epileptiform aktivitást) az ingerlésre adott válaszban. Rövidítések: fEPSP – serkentő posztzinaptikus mezőpotenciál, 2VO – 2-ér elzárás.

Az első kísérletsorozatban a fEPSP-k amplitúdóját monitoroztuk. Az ingerlő stimulus nagyságának megválasztásánál minden kísérletben ügyeltünk arra, hogy szubmaximális ingerlést alkalmazzunk, ami azt jelenti, hogy a maximális amplitúdójú fEPSP-t kiváltó legkisebb impulzus intenzitásának körülbelül 70-80%-át használtuk. A fEPSP regisztrálása analóg-digitális konverter segítségével, regisztráló programmal ellátott számítógépen történt (Experimetria; AIF-03). Az adatokat OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) programmal értékeltük ki.

A szeleteket a fent említett paraméterek mellett kb. 30 percen keresztül ingerelve pihentettük. Erre a fEPSP-k stabilizálódása miatt volt szükség, amint ez megtörtént, egy 10 perces kontroll szakaszt regisztráltunk. Az első kísérletsorozatban résztvevő állatokból nyert szeletek esetén a kontroll szakasz felvételét követően nagyfrekvenciás ingerléssel (theta burst stimuláció, TBS) LTP-t indukáltunk. A TBS során 4 db, 100 Hz-es impulzuscsomag érte a szeleteket, ahol a train-ek időtartama 40 ms, a burst-ök közötti intervallum pedig 350 ms volt. Ezt követően a fEPSP-k amplitúdójának változását további 60 percen keresztül monitoroztuk. A második kísérletsorozat esetén a 10 perces kontroll szakaszt egy 15 perces OGD követte, ezután egy 40 perces periódusban követtük nyomon a fEPSP-k változását (esetleges visszatérését az ischemia után), majd ennek leteltével TBS-sel LTP-t indukáltunk, melyet további 35 percen keresztül regisztráltunk.

Golgi-Cox impregnációs technika

Golgi-Cox festőoldat elkészítése

A Golgi festőoldat elkészítéséhez három törzsoldatot használtunk (I., II. és III.). I. oldat: 5%-os kálium-bikromát, II.: 5%-os higany-klorid, III.: 5%-os kálium-kromát. Mindhárom anyag desztillált vízben (DV) volt oldva. A törzsoldatok hígítása Glaser és Van der Loos metodikája szerint történt (Glaser és Van der Loos, 1981). Golgi-Cox festőoldattá való összekeverésükhöz szükség volt 5 térfogategységre az I. oldatból, 5 térfogategységre a II. oldatból, melyeket összekevertünk. Ezután a III. oldatból 4 térfogategységet kevertünk el 10 térfogategység DV-vel. Ezt követően az I.+II. keverékét lassan, üvegbottal való kevergetés mellett öntöttük össze a III.+DV oldattal. A folyamat sötétített helyiségben történt. A kész elegyet sötét üvegben minimum 5 napig öregítettük a felhasználás előtt. Eközben az üveg alján némi csapadék vált ki, így a festésnél ügyeltünk arra, hogy csak a tiszta felülúszót használjuk.

Kodak fixáló oldat elkészítése

A Kodak fixáló oldat (Eastman Kodak Company) két törzsoldatból tevődött össze. A Kodak-A oldat 25.25 ml DV és 6.25 ml Kodak-A összemérésével készült. A Kodak-B oldat esetén 50.5 ml DV-hez adtunk 0.7 ml Kodak-B-t. A két oldatot a festési eljárás kezdetén kimértük, majd sötét helyen külön tároltuk, és csak közvetlenül a felhasználás előtt öntöttük össze.

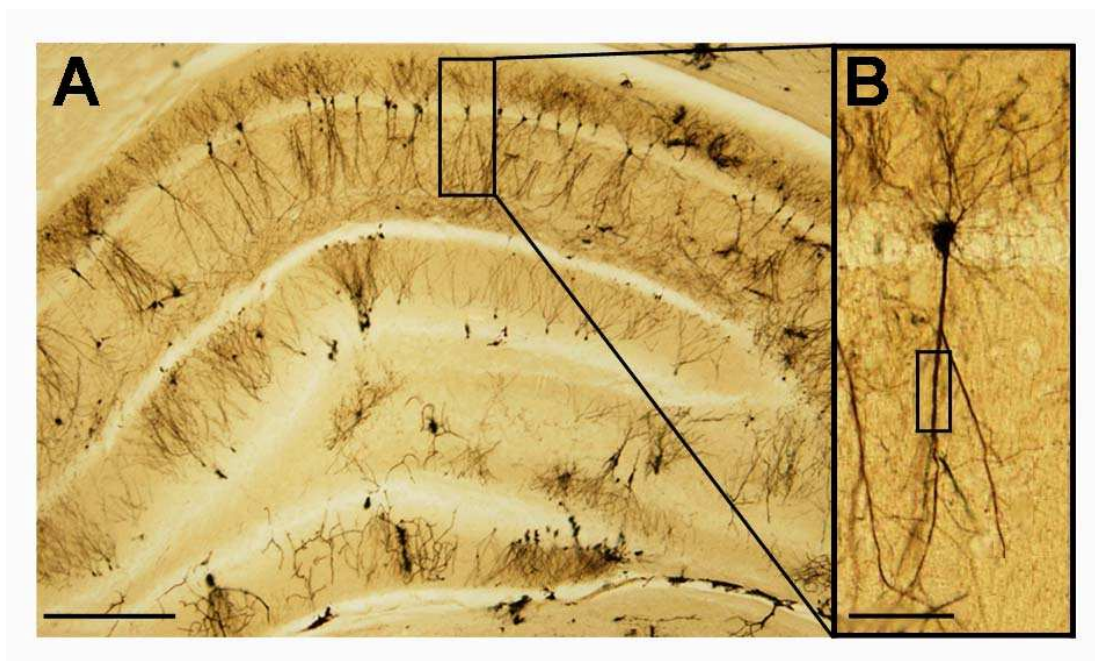
Metszetek készítése, festése

A hippocampus CA1-es régiójának piramissejtjein lévő dendrittüskék számának és denzitásának meghatározása a Golgi-Cox festést követően történt. Az állatok dekapitálása után a hippocampust tartalmazó agyi régió eltávolításának menete megegyezett az elektrofiziológiai kísérletek során alkalmazottal. A coronális metszésű blokkot, mely a teljes hippocampust tartalmazta, Golgi-Cox festőoldatba helyeztük 10 napra, és szobahőmérsékleten tartottuk sötétben. Az időközben kiváló csapadék háttérfestődést okozhat, így annak érdekében, hogy ezt csökkentsük a festőoldatot 2-3 naponta lecseréltük az agyblokkokon. Az impregnáció elkészültével az agydarabokat minimum 2-3, maximum 30 napra 30%-os szacharóz oldatba helyeztük, és hűtőben tároltuk. Erre azért van szükség, hogy az elkészülő

agyszeletek rugalmasabbak legyenek, és ne töredezzenek szét a száradást követően. A hippocampus középső régiójából, vibratóm (Leica VT1000S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Németország) segítségével 100 μ m vastagságú szeleteket készítettünk. A metszés 6%-os szacharóz oldatban történt, majd innen zselatinozott (2%) üveg tárgylemezekre húztuk fel a metszeteket. Ezt követően sötét párasító kamrába helyeztük az elkészült metszeteket, és egy éjszakán át ott tartottuk. Másnap a tárgylemezeket festőkádba tettük, és Gibb és Kolb metodikája alapján kezeltük (Gibb és Kolb, 1998). Az első lépés egy DV-es mosás volt (1 perc), majd 30%-os NH_4OH -ba (VWR, Magyarország) helyeztük, és 30 percre sötét szekrénybe tettük. Ezután ismét egy DV-es mosás következett, mely szintén 1 percig tartott. A következő lépésben megtörtént a fixálás a két komponensből (A+B) álló Kodak Fixáló oldat segítségével. Ez 30 percig tartott, és sötétben zajlott. A szükséges idő elteltével ismét DV-es mosást alkalmaztunk, 1 percen át, majd pedig felszálló alkoholsorral víztelenítettük a metszeteinket. A felszálló alkoholsor a következő volt: 50%-os alkoholban 1 perc, 70%-os alkoholban 1 perc, 96%-os alkoholban 1 perc, abszolút alkoholban 2x5 perc, végül xylolban 10 perc. Miután ezzel végeztünk, fluoromountot (Serva) vittünk fel a tárgylemezre, majd ráhelyeztük a fedőlemezt. Az előhívott metszeteket 24 óráig szabad levegőn szárítottuk, majd fénymikroszkópban vizsgáltuk.

A dendrit tüskék kvantitatív analízise

Az elkészült metszeteinket fénymikroszkópos (Olympus BX51, Tokió, Japán) sztereológiai vizsgálatoknak vetettük alá, melyekhez olaj immerziós objektíveket alkalmaztunk. Minden hisztológiailag vizsgálathoz 4-4 állat 15-15 sejtjét választottunk ki. A hippocampus CA1-es régiójának piramissejtjein az apikális dendriteken lévő spine-ok denzitását analizáltuk. Minden vizsgált sejt esetén ugyanazon, meghatározott régiót tanulmányoztuk. Ez a választott terület az apikális dendriten egy 100 μ m hosszúságú szakasz volt, a sejtesttől 100-200 μ m-re (12. ábra). Azért döntöttünk ezen régió mellett, mert a Schaffer-kollaterálisok itt létesítenek szinaptikus kapcsolatot a CA1-es piramissejtek dendritjein található tüskékkel, ahol létrehozzák a fEPSP-eket, melyek vizsgálata az elektrofiziológiai kísérleteink alapját adta.



12. ábra: A Golgi-Cox impregnáció után kapott hippocampális agyszelet mikroszkópos felvétele. Az „A” fotón a teljes hippocampus látható, melyen az általunk vizsgált CA1-es régió egy reprezentatív piramissejtjét a fekete téglalap keretezi. A „B” fotón ennek a sejtnek a kinagyított képe látható, melyen a fekete téglalap jelzi a mintavételezés területét. Lépték: 500 μ m (A) és 100 μ m (B).

Az apikális dendriteket egy 100x-os nagyítású olaj immerziós objektív alatt választottuk ki, és a látómezőt a megfigyelésre szánt szakaszra állítottuk. A fénymikroszkóphoz kapcsolt kamera segítségével sorozatfelvételeket készítettünk úgy, hogy a vizsgálandó régió minden szakasza legalább egy felvételen fókuszba kerüljön. Ezáltal a metszettől függően egy vizsgálni kívánt 100 μ m-es apikális dendrit szakaszból 5-10 felvétel is készült. A fotókat számítógépre mentettük, majd a sok részből álló, ugyanazon dendritet ábrázoló mikroszkópos felvételeket egy szoftver (ImageJ 1.42q, National Institutes of Health, USA) segítségével egyetlen képfájlba illesztettük össze. A dendrittűskék számolását ugyanezen program segítségével végeztük. A képeket egy munkatársunk - aki a számolásban nem vett részt - kódolta, majd összekeverte. A számolásokat végző 3 független ember csak ezután kapta meg a felvételeket.

Oxigén-glükóz depriváció (OGD), azaz az *in vitro* ischemia előidézése

Az első kísérletsorozatban tapasztalt protektív hatás hátterében húzódó mechanizmusok feltérképezése érdekében, egy másik, jól kontrollálható modellben is megvizsgáltuk az ALC-t. Ez az *in vitro* ischemiás metodika azon alapszik, hogy az ischemiás

inzultus idejére a normál aCSF-et, melyet folyamatosan az agyszeletre perfundálunk, lecseréljük egy úgynevezett OGD aCSF-re. A két folyadék közötti legfontosabb különbségek, hogy az OGD aCSF glükóz helyett szacharózt tartalmaz, valamint oxigén helyett nitrogénnel dúsítjuk. Ezáltal globális ischemiás állapotot hozhatunk létre az agyszeleteken, hiszen a sejtek nem jutnak tápanyaghoz és oxigénhez az inzultus ideje alatt, csakúgy, mint egy teljes globális ischemiás stroke során.

Ennek érdekében a második kísérletsorozatunkat az OGD-s protokoll ideális paramétereinek meghatározásával kezdtük. Ehhez különböző időtartamú ischemiás periódusokat választottunk: 5, 8, 12, 15, 16 és 17 perc. A rövidebb ideig tartó inzultus eredményeként a regisztrált fEPSP-k még mutatnak visszatérést, ezért egy olyan hosszú OGD-s periódust kellett meghatároznunk, melynél ez már nem következik be. Az elektrofiziológiai mérések során fennálló külső elektromos zajt nem tudtuk maximálisan kizárni, így ez a vizsgálatok során a fEPSP-k teljes megszűnése alatt is jelen volt a regisztrátumainkban. Ennek köszönhetően az Eredmények fejezetben bemutatásra kerülő ábrákon az adatpontok sosem vettek fel 0 értéket (annak ellenére, hogy biológiai választ már nem tapasztaltunk). Az OGD-s kísérletek során a fEPSP-k amplitúdóját és meredekségét (más néven slope-ját) is regisztráltuk.

ALC-vel történő kezelések az OGD modellen végzett kísérletekben

Az OGD protokoll megfelelő paramétereinek meghatározása után az ALC esetleges protektív hatását különböző koncentrációkban vizsgáltuk. Az ALC-t a regisztráció 10 perces kontroll szakasza, valamint a 15 perces OGD-s periódus alatt is a szeletekre mostuk, majd az ezt követő 40 perces követési szakaszban, valamint az LTP indukciót követően az agyszeleteket ALC-t nem tartalmazó, oxigenáltatott normál aCSF-fel perfundáltuk. Az ALC-t a kísérleti protokollnak megfelelően normál aCSF-ben, valamint OGD aCSF-ben oldottuk fel a következő koncentrációkban: 125 μ M, 250 μ M és 500 μ M.

Az ALC hatásmechanizmusának vizsgálata

Az ALC protektív hatása mögött húzódó útvonal feltérképezése érdekében egy specifikus foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) blokkolót, az LY294002-t (Tocris, Egyesült Királyság) alkalmaztuk. Ezt 50 μ M-os koncentrációban mostuk az agyszeletekre a 10 perces kontroll és a 15 perces OGD-s szakasz alatt. Ennek megfelelően az inhibítor feloldása normál

aCSF-ben és OGD aCSF-ben történt, melyek az ALC-t már tartalmazták a leghatásosabbnak bizonyuló 500 μ M-os koncentrációban.

Alkalmazott statisztikai módszerek

Az első kísérletsorozatban az eredmények kiértékelésekor a kontroll 10 perc adatait tekintettük 100%-nak, a TBS utáni fEPSP-k amplitúdóit ehhez normalizáltuk. Az adatok statisztikai analíziséhez a Mann-Whitney U-tesztet végeztük el. A hisztológiai vizsgálatainknál az egyes csoportok spine számban mutatott különbségeinek vizsgálatához egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA, Tukey *post-hoc*) használtunk.

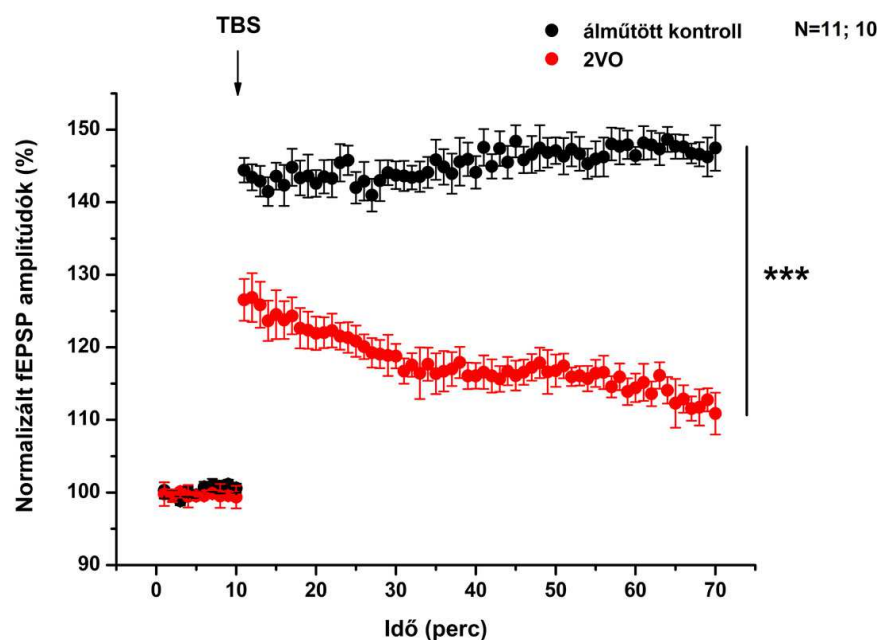
A második kísérletsorozatban a fEPSP-k amplitúdó- és slope-változásaiban megjelenő tendencia szemléltetése érdekében az első 10 perces kontroll periódushoz, mint 100%-hoz normalizáltuk az adatsort, így a 27. és 28. ábrán a teljes regisztrátumok átlagai láthatók. Annak érdekében, hogy az indukált LTP mértékét meghatározzuk, a TBS-t megelőző 10 perces szakaszt (vagyis az OGD-t követő regenerációs fázis utolsó 10 percét) tekintettük 100%-nak, és ehhez normalizálva fejeztük ki az amplitúdó és slope értékek változását (29. és 30. ábra). A statisztikai analízisek során ezen értékeket vetettük össze, melyhez a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk.

A statisztikai számításokat az Origin Pro 8 szoftver (OriginLab Corporation, Northampton, USA) használatával végeztük. Minden esetben a $P < 0,05$, $P < 0,01$ és a $P < 0,001$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

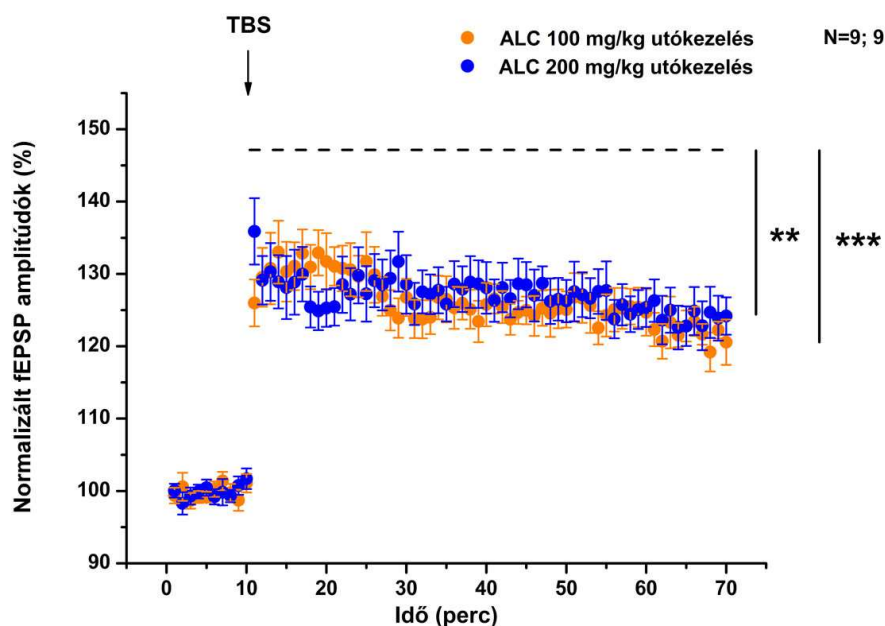
A 2VO-s kísérletsorozat elektrofiziológiai eredményei

Az első kísérletsorozatban az elő- vagy utókezelésben alkalmazott ALC esetleges neuroprotektív hatását a 2VO-s modellen vizsgáltuk elektrofiziológiai és hisztológiai módszerek segítségével. A globális hipoperfúzió által okozott funkcionális károsodásokat LTP vizsgálaton keresztül teszteltük. Az LTP, azaz a hosszú távú potencírozódás a tanulás és memória általánosan elfogadott, sejtszintű modellje, melynek segítségével az oxigén- és glükóz hiányos állapot következtében fellépő károsodások is nyomon követhetőek. Miután a hippocampális szeletekből elektromos ingerlés hatására elvezethető fEPSP-k amplitúdó értékei stabilizálódtak, egy 10 perces kontrollt szakaszt regisztráltunk. Ezt követően TBS-sel váltottuk ki a potencírozódást. Az álműtött kontroll csoport esetében ez egy szignifikáns amplitúdó növekedést ($144.91 \pm 0.34\%$) eredményezett, mely a regisztrációs periódus végéig stabilan fennmaradt. A 30 perces cca okklúzió LTP-re gyakorolt káros hatását a műtétet követő 5 napos túlélési idővel vizsgáltuk. Az álműtött kontroll csoporthoz képest már a TBS-t követő fázisban is szignifikánsan alacsonyabb amplitúdókat ($118.15 \pm 0.44\%$) regisztráltunk, melyek az idő előrehaladásával folyamatosan csökkentek. Az instabil LTP a regisztrációs periódus végére megközelítőleg a kontroll szakaszon mért amplitúdó értékeket eredményezett (13. ábra).



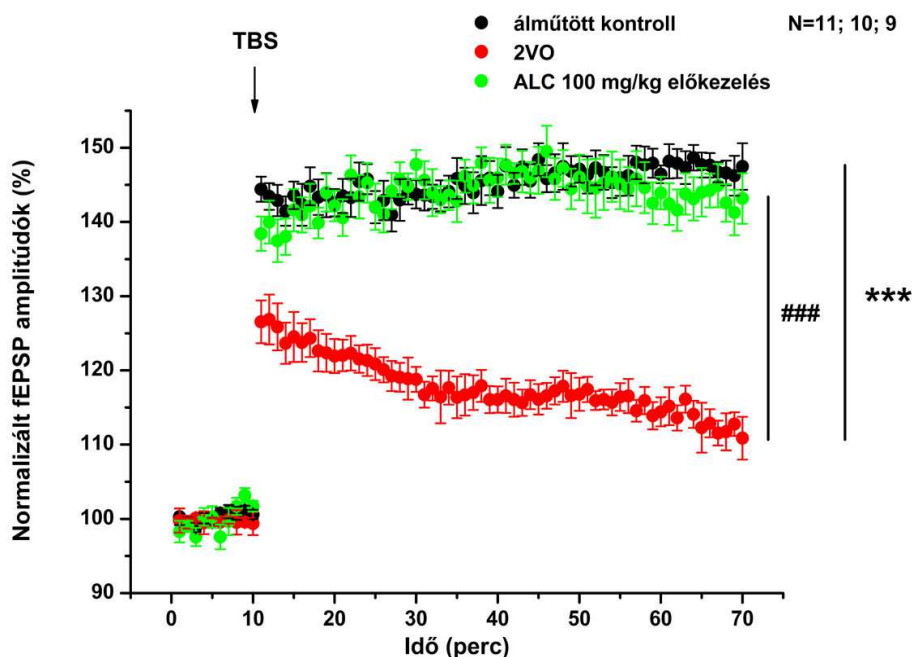
13. ábra: Az álműtött kontroll (N=11) és a 2VO-s (N=10) csoport esetén regisztrált LTP. A kontroll csoport egy órán át is stabilan fennmaradó potencírozódáshoz képest a globális hipoperfúzió szignifikáns mértékű károsodást okozott. Ez az alacsonyabb szintű, csökkenő tendenciájú LTP-ben nyilvánult meg. Az ábrán a nyíl jelzi a 10 perces kontroll szakasz felvételét követően alkalmazott nagy frekvenciás ingerlést (TBS-t). Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják. A csillagok a kontroll és a 2VO-s csoport közötti szignifikáns különbséget jelzik (** $P < 0.001$).

Ezt követően először a 100 mg/kg dózisú ALC utókezelés hatását vizsgáltuk. A TBS hatására bekövetkező $134.30 \pm 0.55\%$ -os potencírozódás csak a kezdeti 15 perces fázisban volt stabil, ezt követően a fEPSP amplitúdók csökkenni kezdtek, majd egy alacsonyabb értéken ($128.37 \pm 0.45\%$) stabilizálódtak. Bár ez a szint szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a 2VO-s csoportban regisztrált, még mindig jelentősen elmaradt az álműtött kontrolloknál regisztráltaktól. Ezek után a kezelés hatékonyságát a dózis emelésével próbáltuk fokozni. Az állatok a 2VO műtetet követően az ALC utókezelést 200 mg/kg-os dózisban kapták, szintén 5 napon keresztül. Az elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a hatóanyag utókezelésben nem képes a globális hipoperfúzió által okozott károsodások kivédésére és az LTP funkció kontroll szintre való helyreállítására, még a megemelt koncentrációban sem. A regisztrált potencírozódás $127.05 \pm 0.30\%$ -os volt, mely egy enyhe csökkenésen ment keresztül a kísérlet végéig (14. ábra).



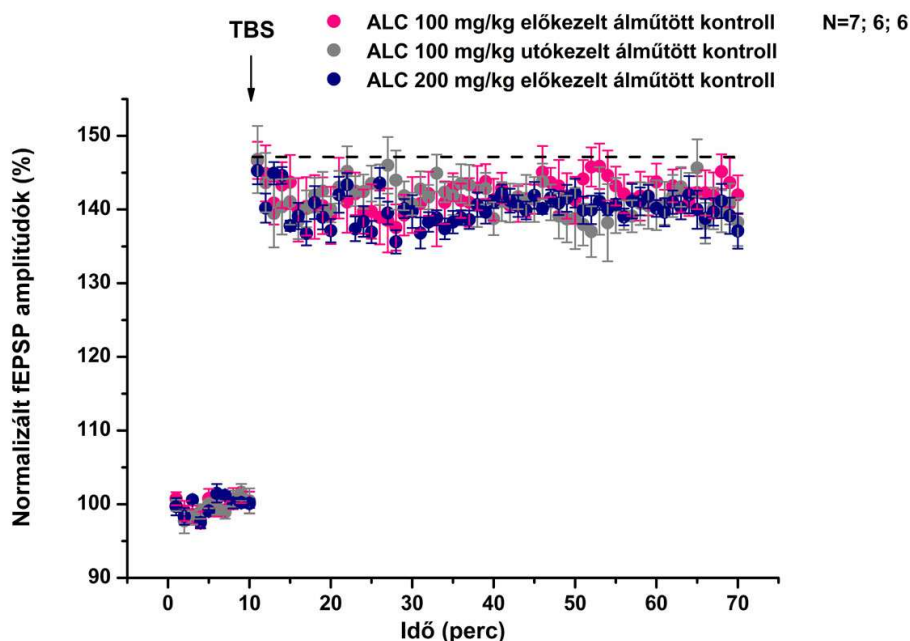
14. ábra: Az ALC utókezelés sem a 100 mg/kg-os (N=9), sem pedig a 200 mg/kg-os (N=9) dózis esetén nem eredményezett jelentős neuroprotekcíót, hiszen a csoportok LTP vizsgálatban mutatott eredményei szignifikáns mértékben különböztek a kontroll csoportnál kapottaktól. Az ábrán a nyíl a 10 perces kontroll szakasz felvételét követően alkalmazott nagyfrekvenciás ingerlést (TBS-t), míg a szaggatott vonal a kontroll csoportban regisztrált LTP szintjét jelzi. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják. A csillagok a kontroll és az egyes ALC utókezelt csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelzik (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

A szakirodalomban található, ALC jótékony hatásának tanulmányozására irányuló kísérletek túlnyomó része azt a megállapítást teszi, hogy az ALC utókezelésben nem, viszont előkezelésben alkalmazva protektív. Ezen adatok, valamint saját kísérleti eredményeink alapján a következő kísérleti csoportban az állatok a hatóanyagot előkezelésben kapták (100 mg/kg) az ischemiás inzultust megelőzően 5 napon keresztül. Az elektrofiziológiai mérésekre az előkezelt csoport esetében is a 2VO-t követően 5 nappal később került sor. Az LTP vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az ALC protektív hatást fejtett ki, hiszen a TBS-t követően a kontroll csoporttal megegyező potenciózódást tapasztaltunk. Ez az amplitúdó növekedés ($143.56 \pm 0.35\%$) a regisztráció végéig stabilan fennmaradt és a globális hipoperfúziós csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb mértékű volt. A kontroll és az ALC-vel előkezelt csoport között nem jelentkezett szignifikáns különbség (15. ábra).



15. ábra: Az ALC előkezelés (N=9) hatására kontroll szintű LTP-t sikerült indukálni, mely szignifikáns mértékben különbözött a 2VO-s csoportnál regisztráltaktól. Az ábrán a nyíl jelzi a 10 perces kontroll szakasz felvételét követő LTP indukciót (TBS-t). Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják. A csillagok a kontroll és a 2VO-s csoport, a kettős kereszttek pedig az ALC előkezelt és a 2VO-s csoport közötti szignifikáns különbségeket jelzik (** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).

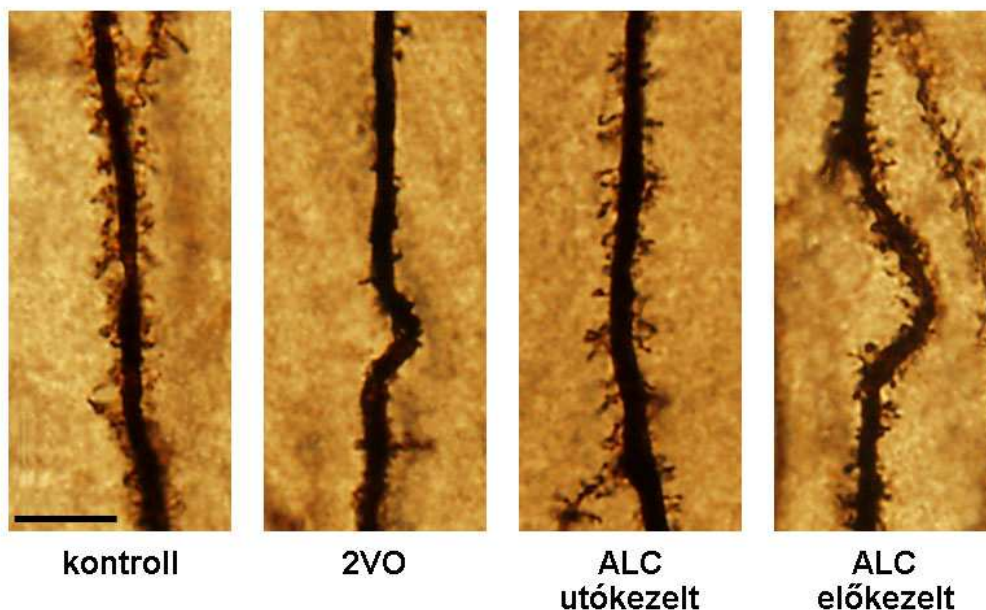
Annak érdekében, hogy az ALC szinaptikus funkciókra gyakorolt esetleges hatását kizárjuk, a hatóanyagot álműtött előkezelt és álműtött utókezelt csoportoknál, mindkét dózis esetén megvizsgáltuk. A potencírozódás mértéke nem mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest egyik esetben sem (előkezelt álműtött: $142.03 \pm 0.37\%$, alacsony dózissal utókezelt álműtött: $141.39 \pm 0.37\%$, magas dózissal utókezelt álműtött: $140.11 \pm 0.26\%$) (16. ábra).



16. ábra: Az ALC kezelés önmagában nem volt hatással a szinaptikus transzmisszióra és plaszticitásra, egyik vizsgált dózis esetén sem. A csoportok (N=7; 6; 6) LTP értékei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoportban regisztráltaktól. Az ábrán a nyíl jelzi a 10 perces kontroll szakasz felvételét követő LTP indukciót (TBS-t), a szaggatott vonal pedig a kontroll csoportban mért potencírozódást. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

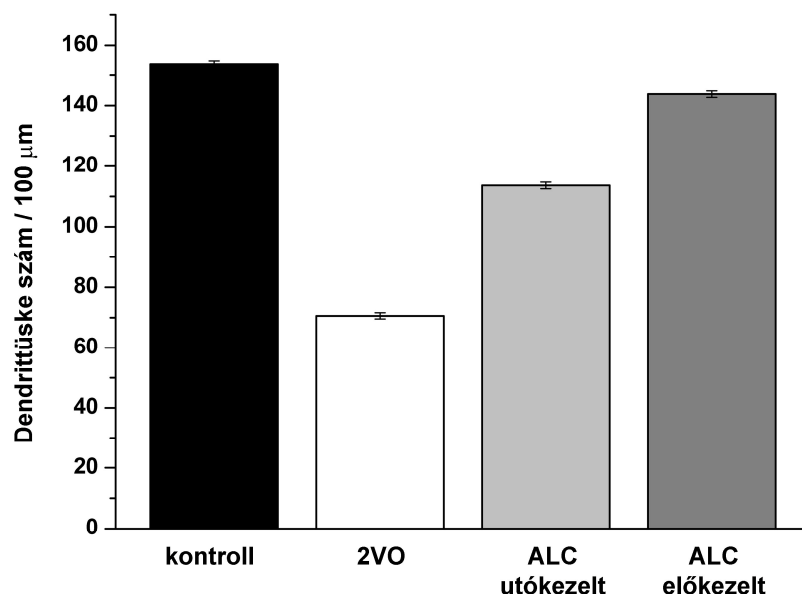
A 2VO-s kísérletsorozat hisztológiai eredményei

A Golgi-Cox impregnációs technikával festett neuronok a hippocampális szeleteken barna, illetve fekete színnel jelölődtek, és egyértelműen felismerhetők voltak a fénymikroszkópos vizsgálatok során. A teljes impregnációt mutató CA1-es piramisisejtek apikális dendritjein a dendrittüskék denzitását vizsgáltuk. A tanulmány nem terjedt ki a spine-ok formájának, illetve egyéb paramétereinek vizsgálatára, bár az eltérő formák (pl.: vékony filopódiumszerű, gomba alakú vagy elágazó) sok esetben felismerhetőek voltak. A Golgi-Cox festéssel történő vizsgálatoknak a kísérletsorozat szempontjából leginkább releváns csoportokat vetettük alá: a kontroll, a 2VO-s, az ALC előkezelt és az alacsonyabb dózisú ALC-vel utókezelt csoportot (17. ábra). Mivel az elektrofiziológiai vizsgálatok – melyek a szinaptikus plaszticitásban bekövetkező változások érzékeny detektálását is lehetővé teszik – nem mutattak különbséget a két utókezelt csoport között, ezért a hisztológiai vizsgálatok elvégzését a 200 mg/kg-os dózis esetén nem láttuk indokoltnak.



17. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvételek a Golgi-Cox technikával festett CA1-es piramissejtek apikális dendritjéről. A fotókon jól látszanak az egyes csoportok közötti különbségek. A globális hipoperfúzió hatására a dendrittüskék száma jelentősen lecsökkent a kontroll csoportéhoz képest. Mindez a kezelések hatására javulást mutatott, az előkezelt csoport esetén kontroll szintű denzitás volt tapasztalható. Lépték: 10 μm .

A kontroll csoportban a vizsgált 100 μm -es szakaszon átlagosan 153.88 ± 0.79 dendrittüske helyezkedett el. A globális hipoperfúzió által okozott káros hatások nem csak az LTP indukálhatóságában, hanem a spine-ok denzitásának csökkenésében is megnyilvánultak, hiszen ebben a csoportban átlagosan 70.58 ± 1.02 dendrittüske volt a kiválasztott régióban. Ahogy az elektrofiziológiai vizsgálatok során sem mutatkozott jelentős javulás az utókezelés hatására, úgy a hisztológiai vizsgálatokban sem érte el az utókezelt csoport spine denzitása a kontroll csoportban tapasztalt értéket ($113.63 \pm 0.73/100 \mu\text{m}$). Az előkezelés protektív hatása viszont egyértelműen megnyilvánult a hisztológiai vizsgálatokban is, hiszen a dendrittüskék száma megközelítette a kontroll szintet: a 100 μm -es apikális dendritikus szakaszon 143.75 ± 0.52 volt (18. ábra). Ezek az adatok alátámasztják az elektrofiziológiai vizsgálatok során kapottakat, ahol a szinaptikus plaszticitás helyreállításának morfológiai alapját a dendrittüskék ALC kezelés hatására bekövetkező megőrzése, vagy esetleges újraképződése teremthette meg.



18. ábra: A hippocampus CA1-es régiójában a piramissejtek apikális dendritjén bekövetkező dendrittüske szám változások. Az ischemiás inzultus hatására jelentősen lecsökkent a dendrittüskék száma, melyet az utókezelés csak részben, az előkezelés viszont teljesen képes volt kivédeni. Minden csoport esetében 4-4 állat 15-15 apikális dendritikus régióját vizsgáltuk. Az egyes csoportok között minden esetben $P < 0.001$ szignifikancia szintet tapasztaltunk.

Az OGD modell paramétereinek beállítása

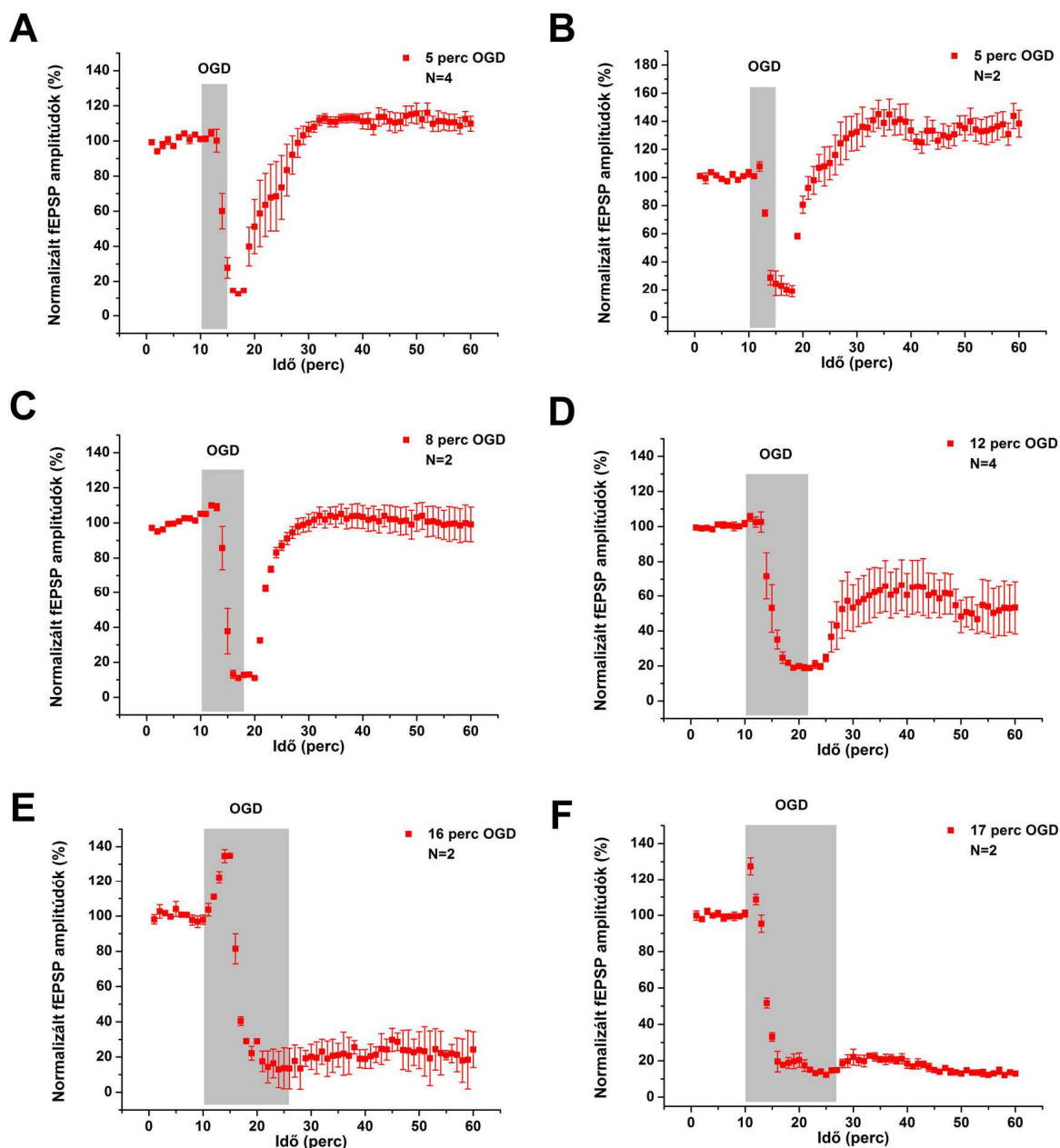
A második kísérletsorozat első részében meghatároztuk azt az OGD-s időtartamot, mely ahhoz szükséges, hogy a hippocampus CA1-es régiójából elvezetett fEPSP-k teljesen eltűnjenek, és az ischemiás periódust követően (oxigenáltatott normál aCSF jelenlétében) se térjenek vissza. Ehhez vizsgáltuk az 5, 8, 12, 15, 16 és a 17 perces OGD hatását is. Az 5 perces ischemiás inzultust követően 4 perccel megjelentek a fEPSP-k a regisztrátumokban, majd további 10 perc elteltével a kontroll szintet is elérték (19/A ábra). 6 próbakísérletet folytattunk az 5 perces OGD-vel, melyből 2 alkalommal nem csak a kontroll szintű regeneráció volt megfigyelhető, hanem az úgynevezett post-ischemiás LTP (post-iLTP) jelensége is, a már stabilizálódott fEPSP amplitúdók értéke a követési periódusban $135.34 \pm 1.05\%$ volt (19/B ábra). Patológias körülmények, mint például az ischemia, illetve az energiahány a hippocampális CA1-es piramissejtek serkentő transzmissziójának hosszú távú változását képesek előidézni (Crepel és mtsai., 1993). Az így létrejövő post-iLTP közös jellemvonásokat mutat a nagyfrekvenciás ingerlés során indukált LTP-vel. Mivel kísérleteink során az 5 perces OGD hatására csupán néhány esetben alakult ki post-iLTP, feltehetően egy

rövidebb ischemiás inzultus (pl.: 3 perces OGD) szükséges ahhoz, hogy a jelenség stabilan létrejöjjön, amely összhangban lenne a szakirodalomban fellelhető protokollokkal (Bagetta és mtsai., 2008).

Az ischemiás inzultus időtartamát növelve a 8 perces OGD hatását vizsgáltuk az agyszeleteken. Az OGD megkezdését követően 4 perccel a fEPSP-k amplitúdói csökkenni kezdtek, majd az inzultus 6. percében teljesen eltűntek. Az ischemia leteltét követően 3 perccel már megjelentek a fEPSP, melyek megközelítőleg 10 perc alatt el is érték a kontroll szintet, ahol stabilan fennmaradtak a regisztráció végéig, post-iLTP pedig már nem jelentkezett ennél az időintervallumnál (19/C ábra).

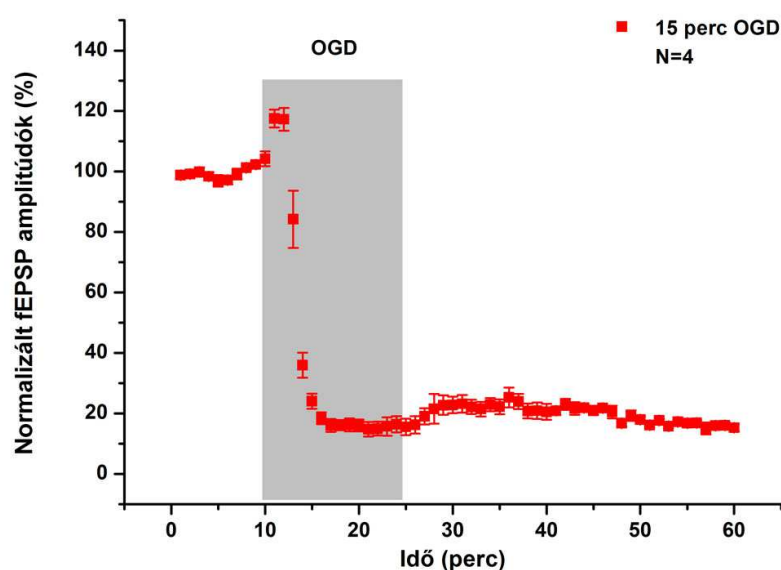
A 12 perces ischemia hatására az OGD 4. percétől egyre kisebb amplitúdójú jeleket regisztráltunk, melyek néhány perccel később teljesen el is tűntek. Az OGD-t követő szakasz 3. percében megkezdődött a fEPSP-k regenerálódása, de az amplitúdók nem érték el a kontroll szintet, mintegy $55.49 \pm 0.81\%$ -os értéken stabilizálódtak (19/D ábra).

Mivel ezek a rövidebb ischemiás inzultusok nem bizonyultak elegendőnek ahhoz, hogy a fEPSP-k teljes eliminációját okozzák, ezért hosszabb periódusokat kezdtünk tesztelni. Mind a 16 (19/E ábra), mind pedig a 17 perces OGD (19/F ábra) hatására teljesen eltűntek a jelek, és a normál aCSF-fel történő perfúzió hatására sem tértek vissza a követési periódusban. Tehát ezek az eredmények már jól mutatták, hogy a modellünkhöz szükséges megfelelő OGD-s időintervallum értéke 16 és 12 perc közé esik.



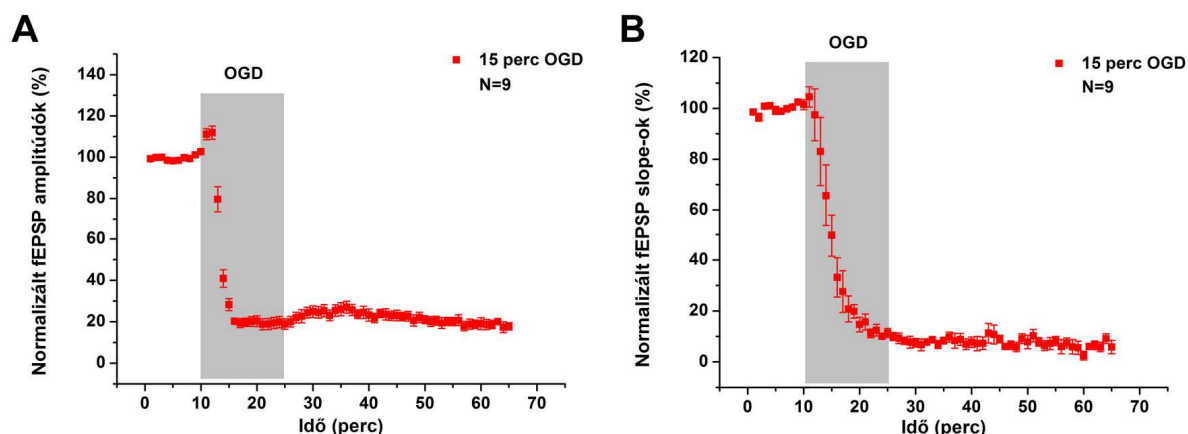
19. ábra: A különböző időtartamú OGD hatása a fEPSP amplitúdókra. A próbakísérletek során az 5 perces OGD (N=4) nem okozott maradandó károsodást a szinaptikus transzmisszióban, az OGD-t követően azonnal megkezdődött a fEPSP-k regenerálódása (A). Az 5 perces inzultus esetén az úgynevezett post-ILTP jelensége is megfigyelhető volt (N=2), melynek során az ischemia hatására bekövetkező szinaptikus transzmisszió-fokozódás a fEPSP amplitúdók (mintegy 35%-os) megnövekedésében nyilvánult meg (B). A 8 perces *in vitro* globális ischemia (N=2) után a fEPSP-k még visszatértek, egy rövid regenerációs periódus után kontroll szinten futottak telítésbe az amplitúdók (C). A 12 perces OGD hatására (N=4) már megfigyelhető volt a károsodás, melyet jól mutatott a szinaptikus transzmisszió romlása. Az inzultust követően a fEPSP-k csak részleges regenerálódást mutattak, és jóval a kontroll értékek alatt futottak telítésbe (D). A hosszabb időtartamú, 16 perces (N=2) és 17 perces (N=2) OGD esetén egyik regisztrátumnál sem tértek vissza a fEPSP amplitúdók (E és F). Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Kísérleteink során arra a megállapításra jutottunk, hogy a 15 percig tartó OGD hatására már nem térnek vissza a fEPSP-k, ugyanakkor ez az inzultus feltehetően még nem okozza a sejtek teljes pusztulását, tehát egy neuroprotektív hatóanyag alkalmazásával még megmenthetők lehetnek. Már a próbakísérleteink (N=4) során is láttuk, hogy az OGD megkezdését követő 3. percben megindul a fEPSP-k amplitúdójának csökkenése, majd a 7. percre teljesen el is tűnnek, és a követési periódusban sem térnek vissza (20. ábra).



20. ábra: A hosszabb időtartamú mérések után az inzultus időtartamát tovább csökkentve a 15 perces OGD hatására már a próbakísérleteknél (N=4) is egyértelműen eltűntek a fEPSP-k, és egyik esetben sem mutattak visszatérést a regisztrációs periódus végéig. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Mivel még a 14 perces OGD esetén is voltak enyhe regenerációt mutató esetek a próbakísérletek során, így a 15 perces OGD-s mérések elemszámát növeltük (N=9), annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy ennek hatására továbbra sem jellemző a jelek spontán visszatérése. A teljes elemszámú csoportnál regisztrált amplitúdó és slope értékeket a 21. ábra szemlélteti.

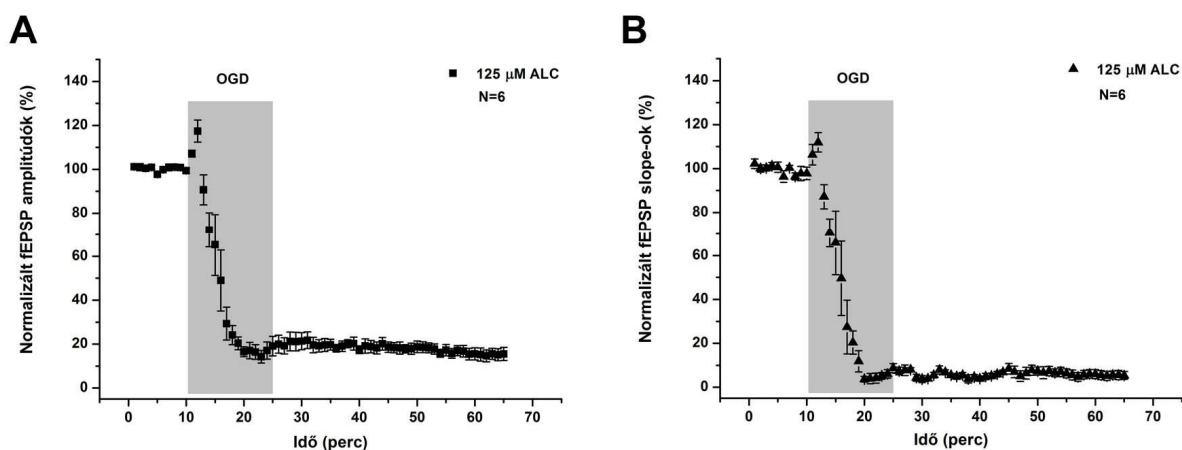


21. ábra: Mivel a 15 perces OGD bizonyult az általunk keresett időintervallumnak, ezért az elemszámot ezen csoport esetén növeltük (N=9). A fEPSP-k amplitúdó és slope értékei továbbra sem mutattak regenerációt. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó, valamint slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Az ALC hatásának vizsgálata OGD modellen: fEPSP regeneráció és LTP

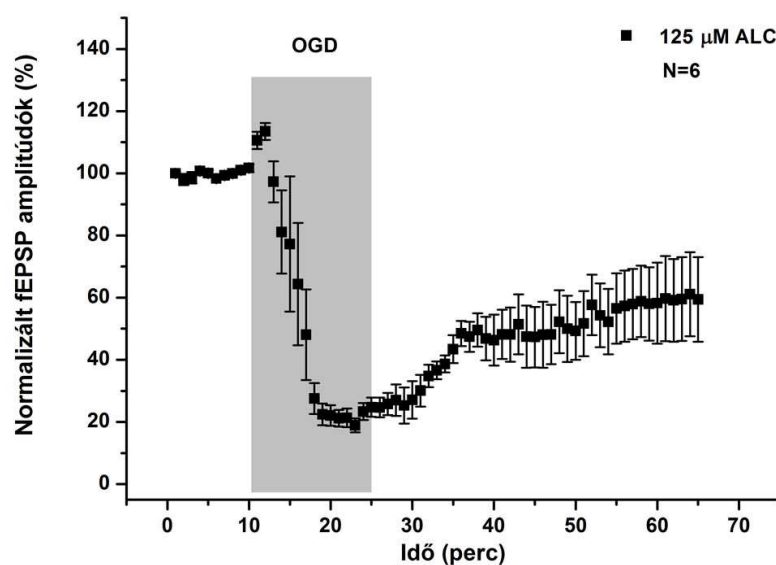
Az OGD modellünk paramétereinek beállítását követően az ALC hatását különböző koncentrációkban vizsgáltuk oly módon, hogy mind a 10 perces kontroll periódus, mint pedig a 15 perces OGD során folyamatosan jelen volt a hatóanyag. Az ezt követő 40 perces követési fázisban azonban csak a normál aCSF-et perfundáltuk a szeletekre. A kísérletek során a fEPSP-k amplitúdóját és meredekségét is monitoroztuk.

A 125 μ M-os koncentráció esetén már megfigyelhető volt az, hogy a jelenlévő ALC hatására az OGD-s periódus alatt később következik be a fEPSP-k teljes mértékű eltűnése, ugyanis ezt egy percről-percre nyomon követhető, fokozatos amplitúdó és slope csökkenés előzi meg. Ennek eredményeként, annak ellenére, hogy a csökkenés már az OGD 3. percében megkezdődik, a teljes elimináció csak a 10. percnél jelentkezik (szemben a 15 perces OGD esetén tapasztaltakkal). A kísérletek egyik felében (N=6) nem volt kimutatható egyéb hatás az ALC kezelés eredményeként, ugyanis a fEPSP-k a követési szakaszban nem jelentek meg (22. ábra).

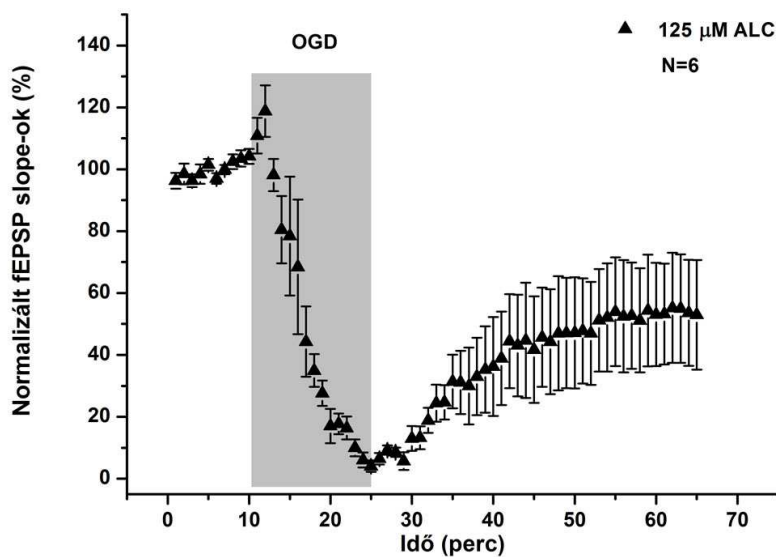


22. ábra: A 125 μ M koncentrációjú ALC-vel kezelt csoportban a regisztrátumok felénél (N=6) nem tapasztaltunk protektív hatást. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó, valamint slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Az esetek másik felében a regisztrált jelek egyértelmű visszatérése az OGD-t követő 5. perc után jelentkezett, majd a növekvő tendenciát egy megközelítőleg $58.69.39 \pm 0.38\%$ -os amplitúdó értéken való stagnálás követte a regisztrációs periódus további részében (23. ábra). A slope-ok esetében is hasonló tendenciák jelentkeztek. Azon eseteknél, ahol a fEPSP-k visszatérést mutattak, a jelek meredeksége az OGD kezdete után 3 perccel csökkenni kezdett, az amplitúdók változásának megfelelően. A visszatérő fEPSP-k meredeksége a kontroll szinthez képest egy $53.14 \pm 0.35\%$ -os értéken stabilizálódott a regisztráció utolsó negyed órájában (24. ábra).



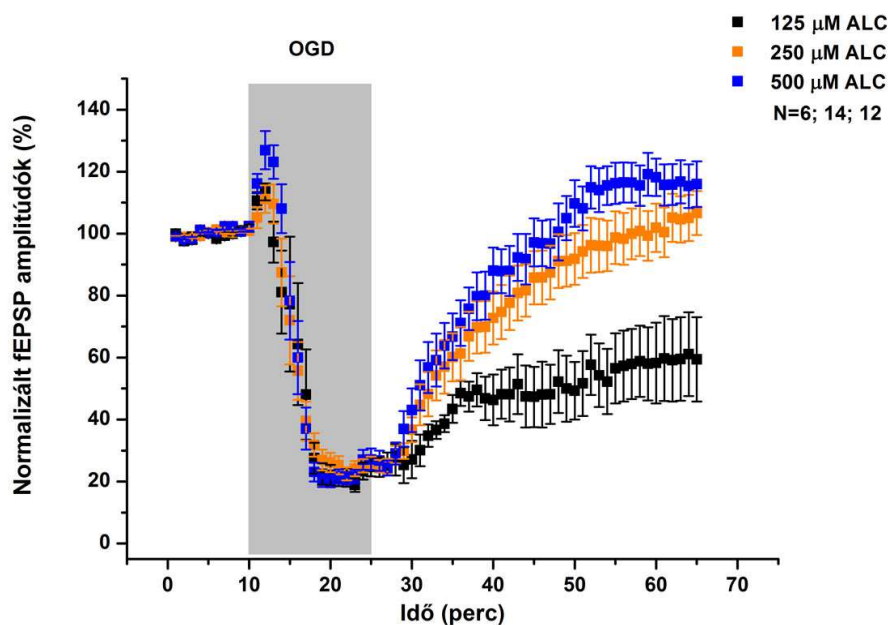
23. ábra: A 125 μ M-os koncentrációjú ALC-vel kezelt csoport másik felében (N=6) már jelentkezett protektív hatás, de a fEPSP amplitúdók nem érték el a kontroll szintet, kb. 58%-os értéken telítésbe futottak. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.



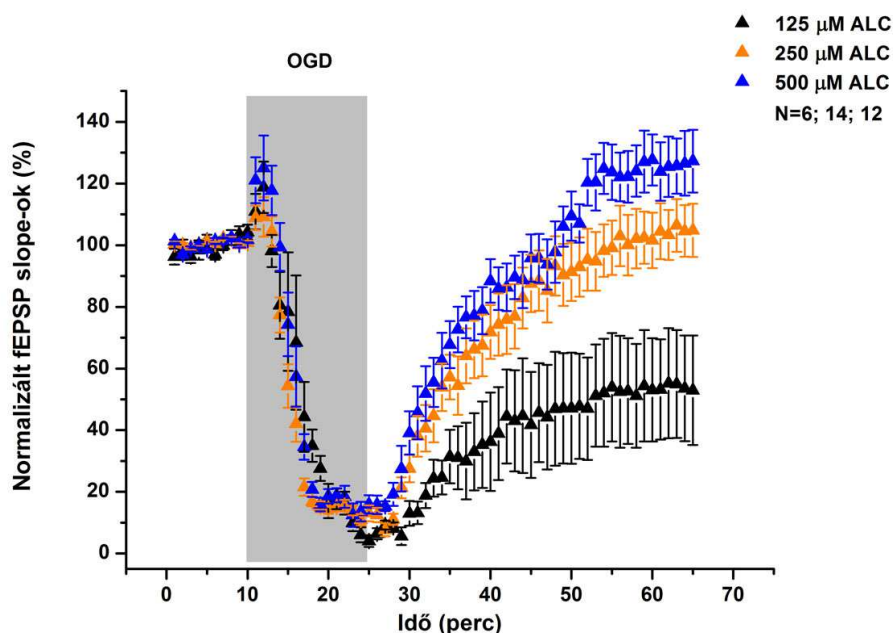
24. ábra: A 125 μ M-os koncentrációjú ALC-vel kezelt csoport másik felében (N=6) regisztrált a slope-ok esetén is megfigyelhető volt a változás, de az értékek nem érték el a kontroll szintet ez esetben sem, kb 53%-on futottak telítésbe. Az adatpontok a normalizált fEPSP slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

A 250 μ M-os koncentrációban jelenlévő ALC hatására az OGD 4. percében kezdtek csökkenni a jelek amplitúdói (és slope-jai), majd további 5 perc elteltével teljesen meg is

szűntek. A jelek visszatérésének kezdete az OGD-s periódus végét követő 4. percre tehető. Az OGD után regisztrált követési periódus végére a fEPSP-k regisztrált értékei visszatértek a kontroll szintre. Az utolsó 10 percben az amplitúdók $102.21 \pm 0.91\%$ -os, a slope-ok pedig $103.27 \pm 0.58\%$ -os értékeket vettek fel (25. és 26. ábra).



25. ábra: A vizsgált koncentrációk hatása az OGD által okozott károsodással szemben. A 125 μM-os (N=6) koncentrációval szemben jóval hatékonyabbnak bizonyult a 250 μM-os ALC (N=14), hiszen a fEPSP amplitúdók kontroll szintre való visszatérését eredményezte. Az 500 μM-os (N=12) koncentráció esetén egy eltérő kinetika körvonalazódott, hiszen a fEPSP-k ebben a csoportban jóval előbb elérték a kontroll szintet, majd további növekedésen mentek keresztül, és végül kb. 116%-on stabilizálódtak. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.



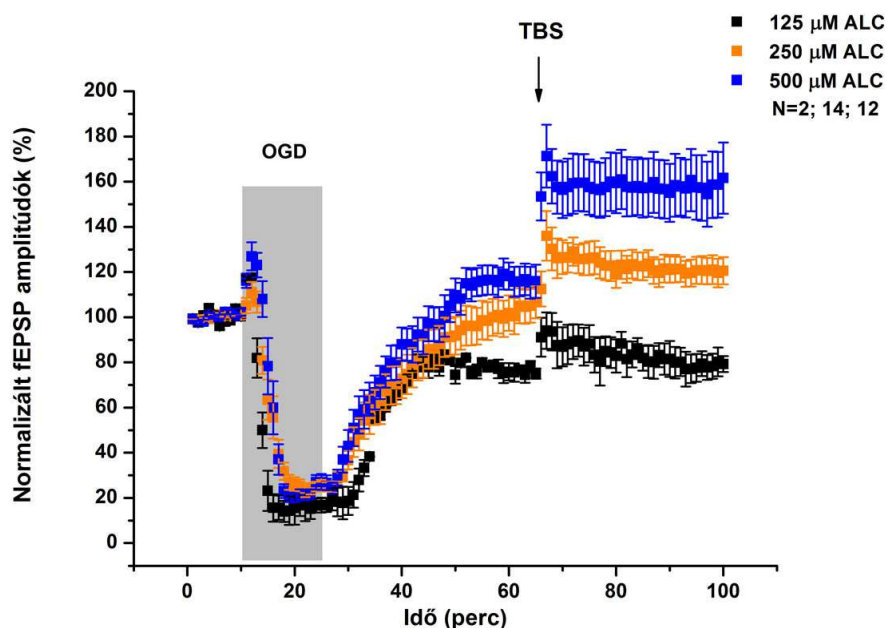
26. ábra: A vizsgált koncentrációk hatása a fEPSP slope-okra OGD-t követően. Az amplitúdókhoz hasonlóan a regisztrált jelek meredekségében is hasonló tendenciájú változások jelentkeztek. A 125 μM -os (N=6) koncentrációjú ALC-vel szemben jóval hatékonyabbnak bizonyult a 250 μM -os (N=14), hiszen ez esetben a regisztrációs periódus végére a slope-ok visszatértek a kontroll szintre. Az 500 μM -os ALC kezelés esetén ez esetben is megfigyelhető volt egy még ennél is dinamikusabb regeneráció, melynek eredményeként a fEPSP slope-ok a kontroll szint felett, kb. 127%-on stabilizálódtak. Az adatpontok a normalizált fEPSP slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

A következő kísérleti csoportnál az ALC hatását 500 μM -os dózisban vizsgáltuk. Az ALC protektív hatása már az OGD alatt is megmutatkozott, hiszen az előző két csoporttól eltérő kinetika jellemezte a fEPSP-k amplitúdójának (és slope-jának) csökkenését, valamint a visszatérésüket, és annak dinamikáját is. Az ischemiás inzultus 5. percétől kezdtek a jelek értékei kontroll szint alá csökkenni, majd megközelítőleg a 10. percére eliminálódtak teljesen. Az OGD-s periódust követően néhány percen belül megindult a regenerációs fázis, majd a regisztráció 45. percére (vagyis az OGD-t követő 20. percre) a fEPSP-k regisztrált értékei elérték a kontroll szintet. Ezt követően azonban még további növekedés volt megfigyelhető, mely néhány perc elteltével véget ért, és az amplitúdó és slope értékek stabilizálódtak. Az utolsó 10 perc stabil értékeinek átlaga az amplitúdók esetében $116.54 \pm 0.38\%$, a slope-ok esetében pedig $127.39 \pm 0.77\%$ volt (25. és 26. ábra).

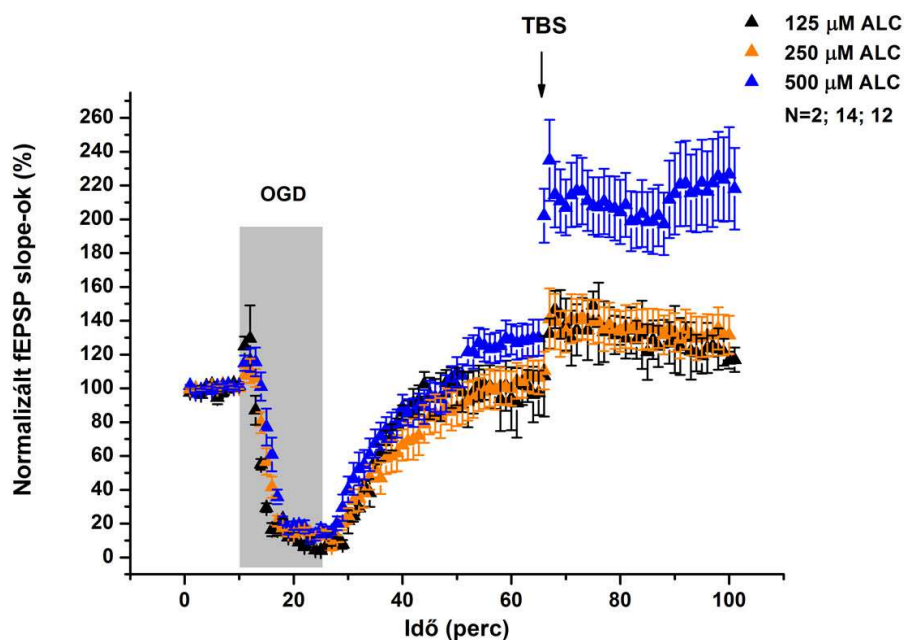
Az OGD-t követő 40 perces követési periódus után az LTP TBS-sel való indukálhatóságát vizsgáltuk. A teljesség kedvéért a 15 perces OGD-s csoportnál is végigvittük

a TBS protokollt, de természetesen – mivel a fEPSP-k regenerációja sem következett be – ekkor sem tapasztaltunk semmiféle biológiai választ, egyik esetben sem.

A három alkalmazott koncentráció esetén kapott trend a 27. és a 28. ábrákon látható, azonban a TBS-t követő amplitúdó- és slope változás meghatározásához a regenerációs fázis utolsó 10 percéhez normalizáltuk az adatsorokat, melyeket a 29. és a 30. ábrák szemléltetnek.



27. ábra: A különböző ALC koncentrációk hatására kialakuló regenerációs trend és az LTP indukciót követő potencírozódás (az első, 10 perces kontroll szakasz értékeihez normalizálva). A trend jól mutatja az egyes koncentrációk közötti különbséget nem csupán a fEPSP amplitúdók OGD-t követő megjelenése tekintetében, hanem a TBS után létrejövő LTP stabilitása szempontjából is. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.



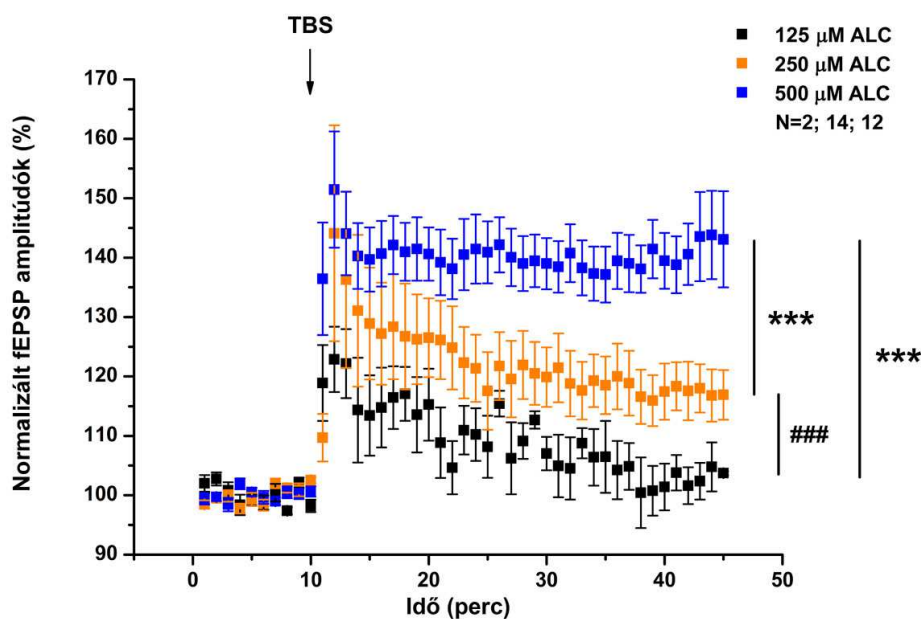
28. ábra: A különböző ALC koncentrációk hatására kialakuló fEPSP slope regenerációs trend és az LTP indukciót követő potencírozódás (az első, 10 perces kontroll szakasz értékeihez normalizálva). A trend – csakúgy, mint az amplitúdók esetében – jól mutatja az egyes koncentrációk közötti különbséget, melyet az OGD-t követő regeneráció és a TBS után létrejövő LTP stabilitása egyaránt tükröz. Az adatpontok a normalizált fEPSP slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Míg a 125 μ M koncentrációjú ALC-vel kezelt csoportban a jelek visszatérése az esetek felében (N=6) megfigyelhető volt, addig a szinaptikus plaszticitás hatékonyságának fokozódása csupán két regisztrátumnál jelentkezett. Ezen eseteknél a fEPSP amplitúdók még jóval a kontroll szint elérése előtt futottak telítésbe ($76.45 \pm 0.44\%$), és ezen értékekhez képest az LTP első 10 percében az amplitúdók $116.87 \pm 1.07\%$ -os értéket mutattak. Ezt követően azonban folyamatosan egy csökkenő tendencia volt jellemző, melynek eredményeként az utolsó 10 percben az amplitúdó értékek visszatértek az OGD utáni telítési szakasz utolsó 10 percéhez közeli értékre ($102.79 \pm 0.53\%$). A fEPSP-k meredeksége a potencírozódást követően $139.71 \pm 4.09\%$ -os értéket mutatott, amely azonban szintén instabillnak bizonyult, így a követési periódus utolsó 10 percében $126.68 \pm 1.17\%$ -ra esett vissza.

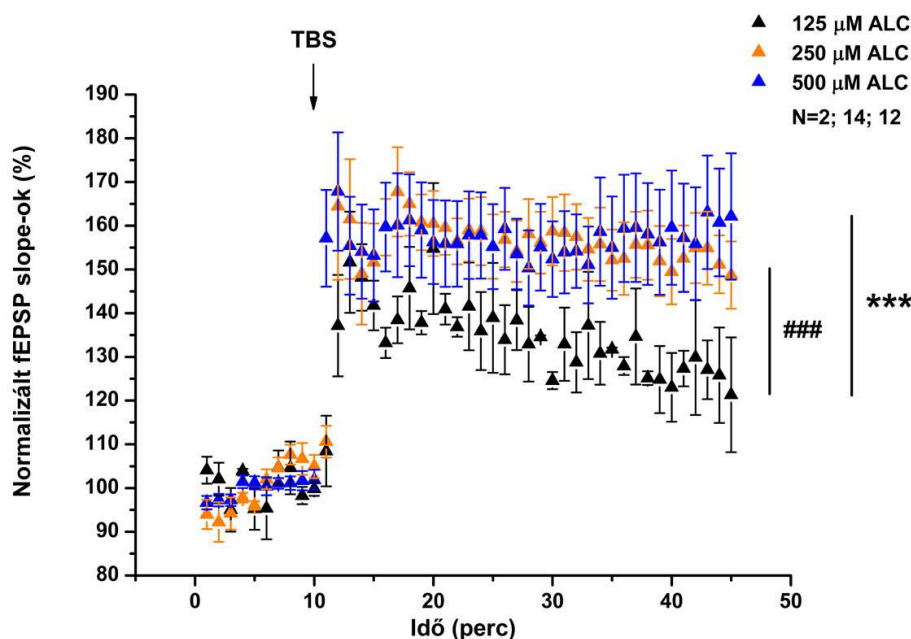
A dózist kétszeresére emelve már sokkal hatékonyabbnak bizonyult az ALC a fEPSP-k regenerációját tekintve, azonban ennek ellenére sem kaptuk a várt eredményeket az LTP vizsgálatok során. A regenerációs periódus utolsó 10 percéhez viszonyítva az indukált potencírozódás a kezdeti szakaszban az amplitúdók esetében $128.51 \pm 2.74\%$, míg a slope-ok esetében $155.09 \pm 5.26\%$ volt. A kialakult LTP némileg stabilabb volt, mint a 125 μ M-os ALC alkalmazása esetén, azonban a követési periódus végére ez esetben is egy enyhe csökkenés

jelentkezett az amplitúdók esetében. A regisztráció utolsó 10 percében a fEPSP-k amplitúdói $117.63 \pm 0.38\%$ -os értékeket vettek fel. A fEPSP-k meredekségét tekintve viszont sokkal stabilabb értékeket regisztráltunk, melyek az utolsó 10 percben is közel maradtak az LTP indukciót követő szinthez ($152.72 \pm 0.78\%$).

A második kísérletsorozatban a legeredményesebb neuroprotektiót az 500 μM -os ALC kezeléssel sikerült elérni. Szintén az utolsó 10 perces regenerációs szakaszhoz normalizálva azt tapasztaltuk, hogy a TBS hatására az 500 μM -os ALC egy stabil, a követési periódus végéig fennmaradó LTP-t eredményezett. A potencírozódás stabilitását jól mutatja, hogy az amplitúdók az LTP első 10 percében $141.77 \pm 1.23\%$, utolsó 10 percében pedig $140.72 \pm 0.66\%$ -os értéket vettek fel. A fEPSP-k meredeksége esetében ezek a szintek az alábbiak szerint alakultak: $158.40 \pm 1.34\%$ és $159.18 \pm 0.75\%$. A csoportban regisztrált slope-ok a 250 μM -os ALC kezelés során kapottakkal közel azonos és hasonlóan stabil értékeket vettek fel, közöttük szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a statisztikai analízis során.



29. ábra: A TBS hatására létrejött amplitúdó növekedés a regenerációs fázis utolsó 10 percéhez normalizálva. A 125 μM -os (N=2) ALC esetén egy alacsony potencírozódást tapasztaltunk (kb. 116%), mely rendkívül instabil volt, és a regisztráció végére a TBS-t megelőző szintre esett vissza. A 250 μM -os (N=14) koncentráció esetén már nagyobb mértékű LTP alakult ki, de ezt is egy csökkenő tendencia jellemezte az amplitúdók esetében. Az 500 μM -os (N=12) koncentrációjú ALC neuroprotektív hatása nem csak a megelőző fEPSP regenerációban, hanem a stabil potencírozódásban is megnyilvánult. A csillagok az 500 μM -os ALC-vel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet, míg a kettős keresztek a 250-125 μM -os csoportok közötti különbséget jelzik (** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$). A magas frekvenciás ingerlés időpillanatát a nyíl jelöli. Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

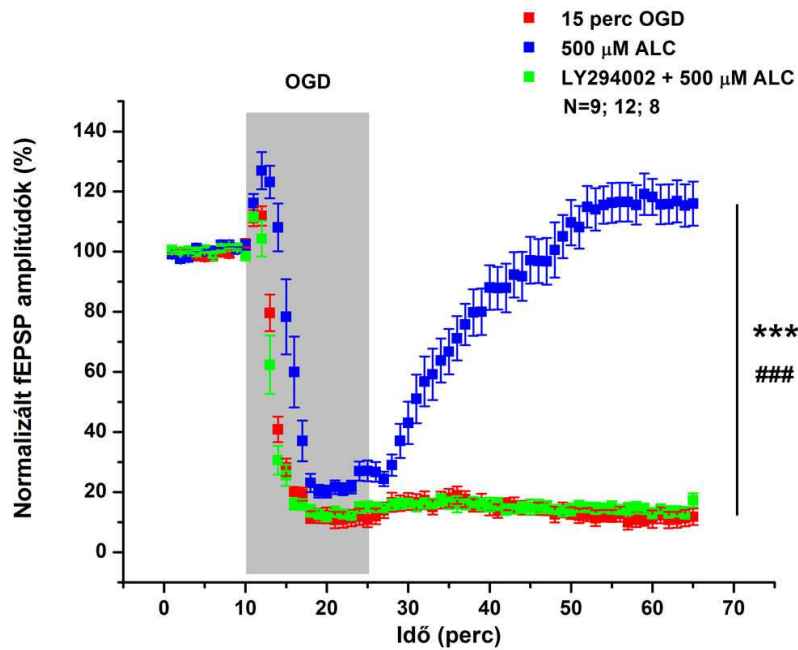


30. ábra: A TBS hatására létrejött slope növekedés a regenerációs fázis utolsó 10 percéhez normalizálva. A 125 μ M-os (N=2) koncentráció esetén tapasztalt slope értékeket nagymértékű instabilitás és egy folyamatos csökkenés jellemezte. Annak ellenére, hogy a 250 μ M-os (N=14) ALC esetén az amplitúdó értékek szintén csökkenést mutattak a követési periódusban, a csoportban regisztrált slope értékek mégis stabilnak bizonyultak. Ez a potencírozódási szint megegyezett az 500 μ M-os ALC-vel kezelt csoportnál tapasztalttal, köztük szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A csillagok az 500 μ M-os ALC-vel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikanciát, míg a kettős keresztek a 250-125 μ M-os csoportok közötti különbséget jelzik (*** P <0.001; ### P <0.001). A magas frekvenciás ingerlés időpillanatát a nyíl jelöli. Az adatpontok a normalizált fEPSP slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

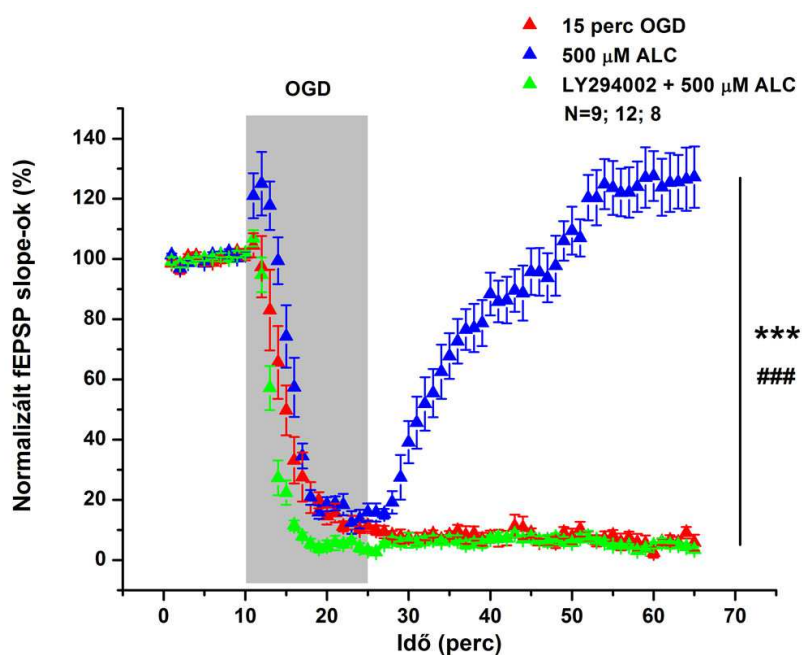
Összefoglalva a második kísérletsorozat során kapott eredményeket elmondható, hogy sikerült megtalálnunk azt az ALC koncentrációt, amely az OGD általi funkcionális károsodásokat kivédi, mely nem csupán a fEPSP-k regenerációjában nyilvánul meg, hanem a TBS által indukált stabil LTP-ben is. Továbbá a különböző koncentrációk alkalmazása során eltérő eredményeket kaptunk, mely mind a regeneráció kinetikájában, mértékében, valamint az LTP indukálhatóságában, szintjében és stabilitásában egyaránt megvalósult. Tehát az ALC hatás dóziszfüggő volt.

Az ALC hatása mögött húzódó lehetséges útvonal vizsgálata

A harmadik kísérletsorozatban célunk volt, hogy az ALC hatás mögött húzódó molekuláris eseményeket feltárjuk, mely nem csupán az OGD-s ischemiás modellben kapott eredményekre adhat választ, hanem a 2VO-s globális hipoperfúziós metodika alkalmazása során kapottakra is. Ehhez szakirodalmi adatokra támaszkodva megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe a PI3K/Akt útvonalnak a hippocampusban tapasztalható protektív hatásban. Ehhez a PI3K egy specifikus inhibitorát, az LY294002-t alkalmaztuk. A blokkoló az ALC-hez hasonlóan a 10 perces kontroll szakaszban és a 15 perces OGD alatt is jelen volt. Mivel az 500 μ M-os ALC koncentráció esetében kaptuk a várt eredményeket és a legkifejezettebb protektív hatást, ezért a hatásmechanizmus vizsgálatokhoz is ezt a dózist alkalmaztuk (a korábbiakkal megegyezően a kontroll és OGD-s szakasz alatt is jelen volt az ALC is). Mind az amplitúdók, mind a slope-ok esetében megfigyelhető volt a csökkenés az OGD 3. percében és a fEPSP-k az ischemiás periódus 9. percére teljesen eltűntek. Már itt is látható, hogy a blokkoló jelenlétében az ALC nem volt képes kifejteni a protektív hatását, hiszen előbb megkezdődött az amplitúdók és slope-ok csökkenése, mint az 500 μ M-os ALC kezelést kapott csoportnál, illetve a fEPSP-k teljes megszűnése is előbb következett be. Az ALC neuroprotektív hatásának teljes blokkolása az OGD-s periódust követően vált nyilvánvalóvá, ugyanis a fEPSP-k nem tértek vissza a követési periódus során (31. és 32. ábra). A teljesség kedvéért annál a csoportnál, ahol a blokkolót és ALC-t egyszerre alkalmaztuk, a fent bemutatott vizsgálatokhoz hasonlóan végigvittük a TBS protokollt. Természetesen – mivel a fEPSP-k regenerációja sem következett be – ekkor sem tapasztaltunk semmiféle biológiai választ, egyik esetben sem (csakúgy, mint a 15 perces OGD esetén).



31. ábra: Az LY294002 (PI3K inhibitor) fEPSP amplitúdókra gyakorolt hatása az 500 μ M-os ALC-vel kezelt hippocampális szeleteken 15 perces OGD-t követően. A blokkoló jelenlétében a korábbiakban effektívnek bizonyuló ALC koncentráció nem volt képes kivédeni az ischemiás inzultus károsító hatását. Ez a fEPSP-k OGD hatására korábban bekövetkező csökkenésében, valamint a regeneráció teljes hiányában egyaránt megnyilvánult. Az ábrán a csillagok az ALC-vel kezelt és az OGD-s csoport közötti, a kettős keresztek pedig az ALC-vel kezelt és a blokkolót is kapott csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelzik (***) $P < 0.001$; ### $P < 0.001$). Az adatpontok a normalizált fEPSP amplitúdó értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.



32. ábra: Az LY294002 (PI3K inhibitor) fEPSP slope-okra gyakorolt hatása az 500 μ M-os ALC-vel kezelt hippocampális szeleteken 15 perces OGD-t követően. A blokkoló jelenlétében a korábbiakban effektívnek bizonyuló ALC koncentráció nem képes kivédeni az ischemiás inzultus károsító hatását, mely a slope-ok vizsgálata során is – csakúgy, mint az amplitúdók esetén – egyértelműen nyomon követhető volt. Az ábrán a csillagok az ALC-vel kezelt és az OGD-s csoport közötti, a kettős keresztek pedig az ALC-vel kezelt és a blokkolót is kapott csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelzik (**P<0.001; ###P<0.001). Az adatpontok a normalizált fEPSP slope értékek átlagát $\pm$ SEM-et ábrázolják.

Tehát ezen kísérletekkel sikerült alátámasztanunk azt a feltételezést, miszerint az ALC hippocampusban megvalósuló protektív hatása mögött a PI3K/Akt útvonalon keresztül kifejtett hatása húzódik. Mivel az ALC potenciális hatásmechanizmusai között számos egyéb útvonalat is leírtak már, természetesen itt sem zárható ki ezek egyidejű megléte.

Eredmények megbeszélése

Agyi hipoxiás állapot, valamint a nyomában fellépő reperfúzió vagy reoxigenizáció számos kórkép központi részét képezi. Ezek között említhető az ischemiás stroke, a traumás agysérülés, a szívroham, az akut légzési distressz szindróma, a magaslati agyi ödéma vagy akár az akut hegyi betegség (Ronaldson és Davis, 2013). A stroke-os megbetegedések nem csupán a negyedik vezető halálokot képezik, de a túlélő páciensek nagy százalékánál maradandó károsodások jellemzőek, ezáltal a hosszú távú fogyatékoságok fő okozója (pl.: motoros deficit, kognitív funkciók súlyos leromlása, önellátás képességének hiánya) (Roger és mtsai., 2012). Az agy adott területein vagy teljes egészén fellépő korlátozott vérátáramlás ischemiás stroke-ot eredményez, mely olyan molekuláris események bonyolult kaszkádját indítja el, amelyek végül szöveti pusztulást eredményeznek (Thompson és Ronaldson, 2014). A stroke korai jeleinek, szimptomáinak felismerésére irányuló nevelési erőfeszítéseknek, valamint az akut ischemiás páciensek trombolitikus terápiával való kezelésének köszönhetően némileg csökkenthető a stroke-ot követő mortalitás és morbiditás (Murray és mtsai., 2010), azonban a betegség megfelelő kezelése még napjainkban sem megoldott probléma. Az akut stroke kezelésére az egyetlen elfogadott hatóanyag az rt-PA, melyet intravénásan alkalmaznak (Stoll és mtsai., 1998). A szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) egy szerin proteáz, amely a zimogén plazminogén aktivációját katalizálja azáltal, hogy széles-specifitású aktív proteáz plazminná alakítja át. Az rt-PA klinikumban való használatát 1996-ban fogadták el, és bár a kezelt pácienseknél a betegség kimenetele javulást mutat, mégis számos korlátozó tényező vonatkozik az alkalmazására. Az ischemiás stroke kezelését célzó klinikai protokoll részét képezi az aszpirin alkalmazása. Az aszpirin az antikoaguláns hatása révén megelőzheti a visszatérő stroke-os eseményeket a stroke bekövetkezése utáni magas kockázatú időszakban (Chen és mtsai., 2000). Az aszpirin azonban kizárólag prevenciós célzattal alkalmazható, hiszen nem rendelkezik semmiféle protektív hatással, valamint nem biztosít kiutat a sérülésből az ischemiás agyszövet számára. Éppen ezért rendkívül nagy szükség van olyan neuroprotektív és/vagy antioxidáns hatóanyagok klinikai alkalmazására, amelyek a stroke terápiás kezelése során hatékonyan „menekítik” az ischemiás agy még megmenthető szöveit.

A potenciális hatóanyagjelölt molekulák vizsgálatára, valamint az ischemia patomechanizmusának tanulmányozására számos modell áll rendelkezésre, melyek

lehetőséget biztosítanak a betegséget jellemző pontos sejtszintű és molekuláris folyamatok megismerésére, mind a fokális, mind pedig a globális ischemia esetén. Ezek precíz ismeretében különböző támadáspontokon és útvonalakon keresztül avatkozhatunk be az ischemia kórlefolyásába a potenciálisan neuroprotektív hatóanyagok segítségével. Sok esetben annak ellenére, hogy a vizsgált molekula állatmodelleken alkalmazva képes meggátolni a neuron-pusztuláshoz vezető folyamatok kaszkádját, klinikai vizsgálatok során már nem mutat meggyőző eredményt, nem javít a stroke kimenetelén. Ennek főbb okai, hogy az emberi agyban fellépő stroke-os inzultusok nagyon heterogén képet mutatnak, továbbá a humán agy és az állatkísérletekben vizsgált, főként rágcsáló agy között anatómiai és funkcionális különbségek vannak, valamint a klinikai próbák során a páciensek általában később részesülnek a hatóanyagos kezelésben a stroke-ot követően, mint ahogy azokat az állatkísérletekben tesztelték (Woodruff és mtsai., 2011). Az is fontos tényező, hogy az adott hatóanyagot milyen módon juttatjuk be a szervezetbe, illetve, hogy az milyen mértékben képes átjutni a BBB-n. Számos molekula alkalmazásának korlátozó tényezőjét jelenti a megfelelő dózis beállítása is pl. abban az esetben, amikor az effektív és a toxikus dózis közel van egymáshoz.

Az egyes neuroprotektív stratégiák és hatóanyag vizsgálatok a stroke által okozott idegszöveti károsodások kivédését, illetve mérséklését célozzák meg. Az ischemia patomechanizmusának pontos ismerete lehetőséget biztosít arra, hogy különböző pontokon avatkozzunk be abba a kaszkádba, mely végső soron az idegsejtek pusztulásához vezet. Csakúgy, mint számos neurodegeneratív betegségben (pl.: Alzheimer-kór, depresszió, stb.), az ischémiás stroke-ban is központi szerepet játszik a mitokondriális diszfunkció. Ehhez köthetően a sejtpusztulás hátterében egyrészt az energiatermelés, pontosabban az ATP termelés sérülése, másrészt pedig a sejthalál útvonalak aktiválódása, illetve azok mediálása áll. A mitokondriumok hibás működése nem csupán a felboruló ionikus egyensúly és a nyomában fellépő energiahány miatt jön létre, hanem ennek oka lehet az ischémiához és az azt követő reperfúzióhoz köthető oxidatív és nitroztatív stressz is. Az 1990-es évek elején számos kutatócsoport figyelme az antioxidánsok (pl.: melatonin, rezveratrol, zöld tea, citrátkör intermedierek) és a metabolikus vegyületek (pl.: ALC, kreatin, Q10 koenzim), mint lehetséges neuroprotektív molekulák felé fordult. S bár ezek hatékonyságát sokáig kétségbe vonták, ma a neuroprotektív kutatások jelentős része ezekre a molekulákra irányul. A kutatások során fontos szempont a molekulák tisztítása, a megfelelő dózis és a biztonsági

profil meghatározása mielőtt széles körben alkalmazhatókká válnak (NIH Office of Dietary Supplements, 2012). E molekulákra általánosságban igaz, hogy képesek a szervezet energia raktárait feltölteni és a fiziológias funkciókat helyreállítani. Amellett azonban, hogy tápanyagként szolgálnak a sejtek számára, farmakológiai modulátoros hatásuk is kimutatható. Ez főként akkor jelentkezik, ha az ajánltnál nagyobb dózisban alkalmazzák. A gyógyhatású tápanyagok és metabolikus vegyületek alkalmazása az egyre fontosabb szerephez jutó nutrigenomikával, metabolomikával és proteomikával együtt a különböző betegségek elleni küzdelemben új, erőteljes frontvonalat nyit az új terápiás lehetőségek kidolgozásában (Virmani és mtsai., 2013).

Az ALC egy olyan molekula, amelyről bebizonyosodott, hogy neuroprotektív hatását számos útvonalon és mechanizmuson keresztül képes kifejteni, köztük a fent említett, mitokondriumokhoz köthető károsodások mérséklése révén. Elősegíti az Ac-Ko-A mitokondriumokba való felvételét a zsírsav oxidáció során, stimulálja a fehérje és membránlipid bioszintézist, stabilizálja a sejtmembránt és az intracelluláris membránokat, antioxidáns aktivitása által csökkenti az oxidatív stresszt, fokozza a mitokondriális és a neuronális energetikát, továbbá elősegíti a javító mechanizmusokat (Jones és mtsai., 2010, valamint Virmani és Binienda, 2004 áttekintő tanulmányok).

A globális hipoperfúzió során fennálló csökkent, globális ischemia esetén megszűnő glükóz- és oxigénellátás, továbbá a reperfúzió hatására fellépő oxidatív stressz szoros összefüggésben áll a mitokondriumok sérült működésével. Ezek az állapotok a kísérleteinkben alkalmazott 2VO és OGD technikákkal jól modellezhetők, és lehetőséget biztosítanak hatóanyag jelölt molekulák vizsgálatára. A sérült energetikával társuló betegségek esetén már számos tanulmányban leírták az ALC protektív hatását, köztük agyi ischemia esetén is (Zanelli és mtsai., 2005; Xu és mtsai., 2014; Picconi és mtsai., 2006).

A megfelelő terápiás ablak megválasztása úgy, mint minden hatóanyagnál, az ALC-nél is rendkívül fontos, hiszen ennek függvényében módosulhat a molekula hatásossága. *In vitro* és *in vivo* globális ischemiás modellen végzett vizsgálatok során kapott eredmények azt mutatják, hogy az ALC a jótékony hatását csak abban az esetben képes kifejteni, ha az inzultust megelőzően történik az alkalmazása (Bagetta és mtsai., 2008; Picconi és mtsai., 2006; Shuaib és mtsai., 1995). Az első kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy az ALC képes-e neuroprotektív hatást kifejteni a globális hipoperfúzió által okozott funkcionális és morfológiai károsodással szemben, illetve, hogy ezen kísérleti felállásban is csak

előkezelés esetén mutatkozik-e meg a jótékony hatás, vagy esetleg utókezelésben is detektálható. Korábbi tanulmányokban már leírták, hogy patkányoknál a 2VO beavatkozást követően jelentős mértékben csökken az agyi vérátáramlás. Két héttel a műtétet követően a hippocampus CA1-es régiójában 78.4%-ra, a prefrontális kéregben pedig 42.4%-ra esik vissza, négy hét elteltével pedig 66.3%-os, illetve 66.5%-os értékek jellemzőek (Otori és mtsai., 2003). 3 hónap elteltével a hippocampus 96%-os, a prefrontális kéreg pedig 82%-os vérátáramlást mutat (Ohta és mtsai., 1997). Ezek az értékek is jól mutatják, hogy a 2VO műtéttel egy olyan csökkent agyi vérátáramlás idézhető elő, amely az időskori krónikus agyi ischémiára jellemző, így ez a modell széles körben elterjedt a krónikus ischémia által okozott kognitív károsodások vizsgálatára, melyek elektrofiziológiai, morfológiai és magatartás vizsgálatokkal is kimutathatóak (Jia és mtsai., 2012; Marosi és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2011). Mindezek a funkcionális és strukturális romlások, illetve változások annak ellenére is bekövetkeznek, hogy sejtpusztulás még a legérzékenyebb hippocampális régióban sem jelentkezik (Marosi és mtsai., 2009). Az elégtelen tápanyag- és oxigénellátás hatására a CA1-es piramis sejtek fiziológias működése zavart szenved, amely a tanulás és memória romlásához, modellünk esetében az LTP csökkenéséhez és instabilitásához vezet. Mivel az apikális dendriteken található spine-ok az információ feldolgozás és a szinaptikus transzmisszió lényeges elemei, és az agy serkentő szinapszisainak 90%-a itt helyezkedik el, így érthető, hogy azok a változások, melyek a spine-okon bekövetkeznek kihatással lesznek a szinaptikus funkcióra, így az LTP-re is. Kutatócsoportunk korábbi munkája során kimutatta a 2VO-t követő dendrittüske-szám csökkenést rövid túlélési időt követően (Nagy és mtsai., 2011), majd egy későbbi tanulmányban Jia és munkatársai ugyanezt vizsgálták hosszabb távú túlélési idő esetén. Eredményeik azt mutatják, hogy a vizsgált 2-16 hét közötti periódusban a spine-ok denzitása szignifikánsan alacsonyabb volt a hipoperfúziós csoportban a kontrollokhoz képest, továbbá az idő előrehaladtával is folyamatosan egy szignifikánsan csökkenő tendencia jellemezte (Jia és mtsai., 2012). A disszertáció alapját képező munkák során a korábbiakkal összhangban lévő eredményeket kaptunk, tehát a 2VO által okozott károsodásokat mind elektrofiziológiai, mind pedig hisztológiai úton is sikerült kimutatnunk. Ezáltal egy pontos, stabil rendszer állt rendelkezésünkre az ALC, mint potenciális neuroprotektív hatóanyag vizsgálatára. Az általunk alkalmazott dózis megválasztása során szakirodalmi adatokra támaszkodtunk (Scafidi és mtsai., 2010; Di Cesare Mannelli és mtsai., 2009; Zaitone és mtsai., 2012). Abban az esetben, mikor az ALC-t utókezelésben

alkalmaztuk mind az LTP-ben, mind pedig a dendrittüske számban mutatkozott javulás a 2VO-s csoporthoz képest, de a kapott értékek mindkét vizsgált paraméter esetén szignifikánsan eltértek a kontroll csoporttól. Mivel a dózis megkésztetése sem vezetett jobb eredményre, ezért a hatóanyagot előkezelésben kezdtük tesztelni. Ez esetben már az alacsonyabb (100 mg/kg-os) dózis is hatásosnak bizonyult. A vizsgálati csoportot kontroll szintű LTP és dendrittüske szám jellemezte.

Az elő- és utókezelésben kapott eredmények összhangban vannak más kutatócsoportok által leírtakkal, miszerint az ALC csak előkezelésben alkalmazva képes protektív hatást kifejteni (Picconi és mtsai., 2006; Shuaib és mtsai., 1995). Feltehetőleg az ischemiás inzultust követően azonnal fellépő Glu excitotoxicitás – vagy a reperfüzió által okozott oxidatív stressz – olyan mértékű, visszafordíthatatlan károsodásokat okoz, melyet a reperfüzió után egy órával alkalmazott ALC kezelés nem képes kivédeni. Ugyan rendelkezésre állnak olyan irodalmi adatok is, melyek az ALC excitotoxicitással szemben mutatott protektív hatásáról számolnak be sejt kultúrák esetén (Zanelli és mtsai., 2005; Forloni és mtsai., 1994), mégis fontos szem előtt tartanunk az ehhez szükséges időablak ideális megválasztását. Zanelli és munkatársai kísérleti paradigmájában a kortikális neuronális sejt kultúrát NMDA-val indukált excitotoxicitásnak vetették alá, mellyel egyidőben ALC kezelést is alkalmaztak. A sejt-életképességi méréseket közvetlenül és 24 órával a kezelések után is elvégezték, és mindkét esetben sikerült kimutatni az ALC protektív hatását. Míg az NMDA expozíció hatására szignifikáns sejtpusztulást detektáltak, addig az ALC-vel kezelt sejtenyészeteknél ez nem jelentkezett egyik vizsgálati csoportnál sem. Tehát az ALC citoprotektív hatását az excitotoxicitás akut és késői fázisában is sikerült kimutatniuk (Zanelli és mtsai., 2005). A Glu excitotoxicitással szembeni védelmet az ALC több útvonalon keresztül is megvalósíthatja. Ezek között említhetjük a Glu receptorok direkt antagonizálását, a γ -amino-vajsav (GABA) receptorok aktiválását (amely hiperpolarizációt eredményezve meggátolja az NMDA receptorok aktiválódását) (Forloni és mtsai., 1994), illetve egyéb, másodlagos mechanizmusok gátlását (pl.: a mitokondriális átmeneti permeabilitási pórus aktiválódásának, ezáltal a citokróm-c kiáramlásának blokkolását, ROS termelődés megakadályozását) (Starkov és mtsai., 2002). Mind a klinikumban alkalmazott, egyetlen terápiás lehetőség – a trombolízis – mind pedig számos neuroprotektív kutatás során az egyik legfontosabb, limitáló tényező az időfaktor. Mivel az ischemiás stroke-on átesett páciensek csak igen kis hányada jut el az inzultust követő első 3 órában a klinikákra, és az

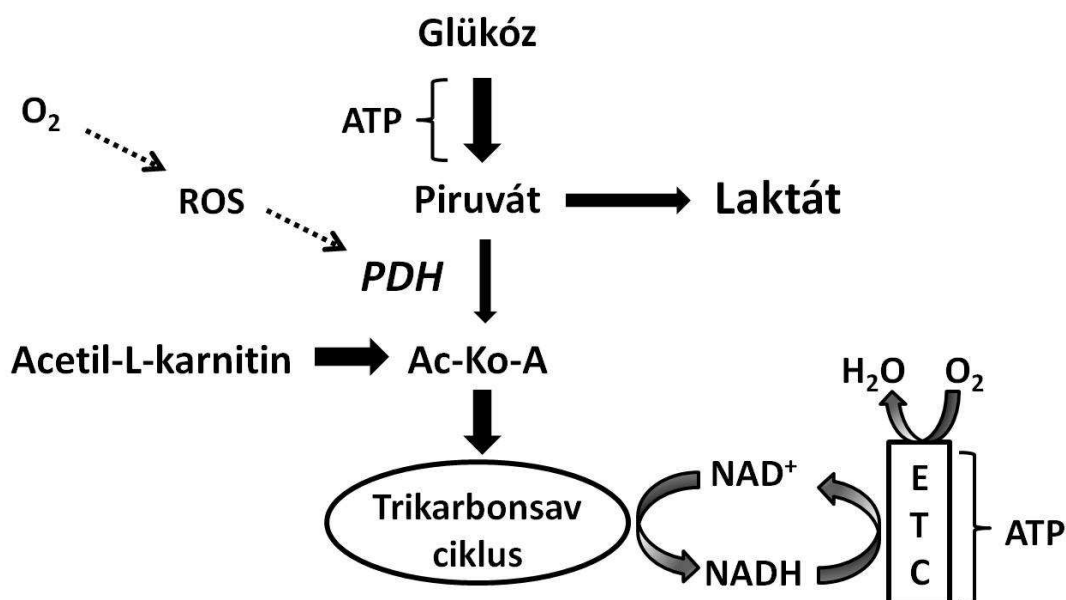
ALC 1 órával később alkalmazva jelentős javulást a kísérletekben sem hozott, a megfelelő terápiás ablak, illetve lehetőség megválasztásánál az előkezelésre kell fektetnünk a hangsúlyt. Természetesen az utókezelésnek klinikai szempontból nagyobb jelentősége lenne, de mivel egy endogén molekuláról van szó, a preventív céllal történő alkalmazási lehetőség jelentősége sem hanyagolható el.

A második kísérletsorozat során célunk volt egy OGD-s *in vitro* ischemiás rendszer beállítása, melynek segítségével nem csak az ALC hatékonyságának vizsgálata, de a lehetséges hatásmechanizmus feltárására is lehetőség nyílt. Az OGD metodika során egy olyan időtartamú ischemiát választottunk, amelyet követően a hippocampusban regisztrált fEPSP-k már nem térnek vissza az inzultust követően. Ilyen kondíciók mellett egy molekula esetleges neuroprotektív hatását vizsgálva a prekonceptió az, hogy az ischemia károsító hatását kivédve elősegíti fEPSP-k visszatérését. A modellel kapcsolatban itt fontos megjegyezni azt is, hogy a túl rövid ideig tartó ischemiás inzultus alkalmazása az úgynevezett post-iLTP kialakulásához vezet (Crepel és mtsai., 1993). Neuroprotektív kísérletekben elterjedt a hatóanyagok post-iLTP modellen történő vizsgálata is, mely során az a cél, hogy az LTP ezen patológiás formájának kialakulását megakadályozzák. Az OGD-s protokoll beállítása során az 5 perces ischemiás inzultus esetén a regisztrátumok egy részénél tapasztaltuk is a jelenséget, amely feltehetően egy még rövidebb időtartam választása mellett stabilan jelentkezett volna minden mérésnél. Striatális agyszelet preparátumokon kimutatták, hogy az ALC neuroprotektív szerepét a post-iLTP-vel szemben is képes kifejteni, ugyanis előkezelésben alkalmazva meggátolta annak kialakulását (Bagetta és mtsai., 2008).

A modell paramétereinek pontos meghatározását követően az ALC hatását különböző koncentrációk alkalmazása mellett vizsgáltuk. A kísérletek során egyrészt arra kerestük a választ, hogy az ALC képes-e a hippocampális szeleteken olyan protektív hatást kifejteni, mely által a fEPSP-k az inzultust megelőző kontroll szintre térnek vissza. Másrészt azt is vizsgáltuk, hogy az ischemiát követően indukálható-e LTP. A csak OGD-n átesett agyszeletek esetében az ischemia visszafordíthatatlan károsodásokat idézett elő, így a normál perfúziós folyadék áramoltatásakor sem tapasztaltunk biológiai jelet egyik esetben sem, és természetesen a magas frekvenciás ingerlés hatására sem jelentek meg. Bár irodalmi adatok vannak arra vonatkozóan, hogy már a 100 μM -os ALC is neuroprotektív (Picconi és mtsai., 2006), a mi kísérleti elrendezésünkben (az előkísérletek során) ez a koncentráció nem eredményezett hatást. Ezt követően 125, 250 és 500 μM -os koncentrációkkal végeztük a

kísérleteket. Mindhárom esetben megjelentek a fEPSP-k az ischemiát követően, amely folyamat a három koncentráció esetén eltérő kinetikát mutatott. A 125 μ M-os koncentráció esetén a fEPSP-k egyrészt később kezdtek visszatérni, mint a magasabb dózisok alkalmazása esetén, valamint az amplitúdók növekedése és a jel meredeksége is lassabban változott. Továbbá a 40 perces követési periódus végére sem érték el a kontroll értékeket. A 250 és 500 μ M-os ALC hatására a jelek vizsgált paraméterei dinamikusabban változtak, és elérték a kontroll szintet. Ez esetben is megfigyelhető volt a különbség két koncentráció között. Tehát ezen kísérletekkel nem csupán az ALC neuroprotektív hatását sikerült igazolnunk, hanem annak koncentráció függését is. Mivel ebben a kísérletsorozatban az LTP indukálhatóságát is vizsgáltuk, nem csupán azt a koncentrációt kellett meghatároznunk, amely a fEPSP-k kontroll szintre való visszatérését eredményezi, hanem azt is, amelynél már stabil LTP alakul ki. Annak ellenére, hogy a 250 μ M-os ALC hatására kontroll szinttel megegyező értékeket mutattak a fEPSP-k az OGD után, a kiváltott LTP nem bizonyult stabilnak, a követési periódusban az amplitúdókat egy csökkenő tendencia jellemezte. Ezt az 500 μ M-os dózis sikeresen kivédte, és egy stabil LTP-t jött létre. Az OGD-s kísérletsorozatban kapott eredmények azt mutatják, hogy az ALC képes olyan protektív hatást kifejteni, amely a szinaptikus transzmisszió helyreállításához is hozzájárul, valamint a megfelelő dózis alkalmazása esetén a funkcionális javulás a szinaptikus plaszticitásban is megnyilvánul. Az ALC *in vivo* és *in vitro* ischemiás modellben való vizsgálata során kapott eredmények egyértelműen mutatják, hogy a hatóanyag protektív volt az inzultussal szemben. Mivel az elmúlt években az ALC-vel végzett intenzív kutatások eredményei számos alkalommal – különböző neurodegeneratív elváltozások esetén vizsgálva – hasonlóan biztatóak voltak, ezért a hatás mögött húzódó mechanizmusok feltérképezésére is jelentős számú kísérlet irányult már (Di Cesare Mannelli és mtsai., 2009; Bagetta és mtsai., 2008). Az ALC azért is egy igen ígéretes molekula, mert a protektív hatását számos útvonalon keresztül képes kifejteni. A metabolizmust érintő hatásai között az egyik fontos aspektus az, hogy fontos szerepet játszik a zsírsavak β -oxidációjában. Annak ellenére, hogy fiziológiai körülmények között az agy számára a glükóz jelenti az elsődleges tápanyagforrást, ha az energiaellátása veszélybe kerül, akkor a sejtek működéséhez, illetve túléléséhez egyéb szubsztrátok is felhasználásra kerülhetnek. Ilyen alternatív tápanyagok lehetnek a ketontestek (Robinson és Williamson, 1980), a laktát (Wyss és mtsai., 2011), vagy akár a zsírsavak (Ebert és mtsai., 2003). Mivel ez utóbbi metabolizálásában a karnitinek is részt vesznek, így ischemiás körülmények között egy

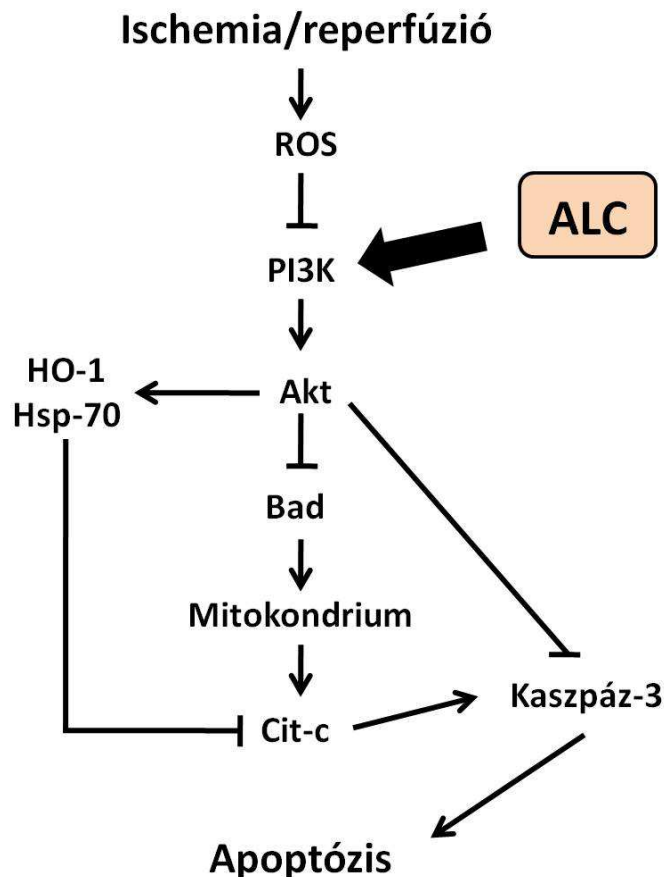
alternatív energianyerési utat nyithatnak meg az idegszövet számára. Ismert tény az is, hogy egy rövid ideig tartó agyi ischémiát követően a glükóz oxidáció szignifikáns csökkenést mutat a reperfúziót követő egy órán belül, és ez a szint több órán keresztül fennáll (Sims, 1995). Ennek legfőbb oka a PDH komplex aktivitásának csökkenése (Fukuchi és mtsai., 1998), amely egy elengedhetetlen kapcsolóelemtként funkcionál az aerob és az anaerob metabolizmus között azáltal, hogy katalizálja a piruvát Ac-Ko-A-vá történő átalakulását (Reed, 1981). Az agy érzékenyebb területein megfigyelhető a komplex működésének reperfúzió után létrejövő gátlása (Bogaert és mtsai., 1994; Zaidan és mtsai., 1998), melynek az a következménye, hogy jelentős mértékben lecsökken az Ac-Ko-A termelés. Ilyen körülmények között az ALC egy exogén, alternatív acetil forrásként szolgálhat az agy számára, ezzel elősegítve az oxidatív agyi energiatermelést és minimalizálva az anaerob glikolízist és laktát acidózist (33. ábra) (Zanelli és mtsai., 2005).



33. ábra: Egy lehetséges ALC hatásmechanizmus agyi ischémiát követően. Az ALC egy alternatív, exogén Ac-Ko-A forrásként szolgálhat, ezáltal pedig elősegítheti az aerob (ETC-n keresztül végbemenő) energiatermelést és csökkentheti a laktát felhalmozódás által indukált acidózist. Az ischémiás/reperfúziós sérülések során felszabaduló ROS egyik fő célpontja a PDH komplex, melynek működése gátlás alá kerül. Mivel ez az enzim képez hidat az aerob és anaerob agyi metabolizmus között, így sérülése estén az agyi laktát szint jelentősen megemelkedik. Mivel a PDH által katalizált enzimreakciótól disztálisan lép be az ALC a folyamatba, ezért az aerob energiametabolizmus elősegítésével kiutat jelenthet az agyi ischémiás sérülést követően az idegszövet számára. Rövidítések: ROS – reaktív oxigén gyökök, PDH – piruvát-dehidrogenáz, Ac-Ko-A – acetil-Koenzim A, ETC – elektron transzport lánc (Zanelli és mtsai., 2005 nyomán módosítva).

Ezt a hatásmechanizmust az az indirekt bizonyíték is alátámasztja, miszerint a szabad karnitin és acetát együttesével kezelt állatoknál nem mutatható ki neuroprotekció (Martin és mtsai., 2005). Az ALC hatása mögött számos egyéb mechanizmust feltételeznek, melyek között említhetjük a kolinerg neurotranszmisszió fokozását, antioxidáns és antiapoptotikus hatást. Állatkísérletes és klinikai tanulmányokban is leírták, hogy az agyi kolinerg neurotranszmisszióban bekövetkező zavarok tanulási és memória diszfunkciókat okoznak (Yakel, 2013). A kolinerg rendszer sérülése agyi ischemia esetén is fellép: csökken az acetil-kolin felszabadulás, és az agy különböző területein (pl.: a hippocampusban) kimutatható a kolin-acetiltranszferáz immunoreaktivitásának megszűnése (Iwasaki és mtsai., 1996). A hippocampus CA1-es régiójában mindamellett, hogy az LTP kialakulásában az NMDA receptorok aktivációja elengedhetetlen, azt is leírták, hogy a kolinerg aktiváció is elősegíti a potencírozódást (Blitzer és mtsai., 1990). Korábban már kimutatták, hogy az ALC az ischemiás sérülésekkel szembeni protektív hatását a kolinerg szinaptikus transzmisszió aktiválásán keresztül is kifejti (Picconi és mtsai., 2006; Ando és mtsai., 2001). Ennek ismeretében az LTP kísérleteink során kapott eredmények háttérében az is állhat, hogy az ALC kezelés a kolinerg rendszeren keresztül fejtette ki a hatását. Másik fontos aspektusa a lehetséges hatásmechanizmusoknak a molekula antioxidáns tulajdonsága. Az ALC képes megakadályozni a hippocampusban a tranziens előagyi ischemia hatására bekövetkező glutation-szint csökkenést, és visszaállítani azt a kontroll értékre (Al-Majed és mtsai., 2006). Továbbá megelőzi a malondialdehid koncentráció növekedését, fokozza a szuperoxid-dizmutáz aktivitását sejtkultúrákban OGD-t követően (Zhang és mtsai., 2012), valamint képes védelmet biztosítani a lipidperoxidációval szemben (Yasui és mtsai., 2002). Az OGD-s kísérleti elrendezéssel a globális ischemia jól modellezhető, hiszen a fellépő hipoxiás és hipoglikémiás állapot hasonlóképpen a normál működés felborulását eredményezi, amely végső soron a sejtek apoptotikus és nekrotikus úton történő pusztulásában manifesztálódik. Mivel korábbi tanulmányokban beszámoltak az ALC antiapoptotikus hatásáról, ezért a harmadik kísérletsorozat részeként ezen megközelítésből vizsgáltuk a kísérleti eredményeink mögött húzódó lehetséges mechanizmust. A PI3K/Akt útvonal az egyik fő intracelluláris szignalizációs lehetőséget jelenti a különböző sejtes folyamatok szabályozásában, többek között a sejtsztódás, a túlélési folyamatok és az inzulinra vagy tápanyagokra adott sejtválaszok regulációjában (Cantley, 2002). A növekedési faktorok által aktivált PI3K foszforilálja a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2), amely ezáltal foszfatidilinozitol-

3,4,5-trifoszfát (PIP3), a legfontosabb másodlagos hírvivő molekulává alakul. A PIP3 az Akt, vagy másik nevén a protein-kináz B (PKB) nevű fehérjéhez kötődik, és annak konformációs változását idézi elő. Ez ahhoz szükséges, hogy ezáltal az Akt foszforilációját a foszfoinozítid-függő protein-kinázok (PDK) a Thr308-as és Ser473-as pozícióban elvégezhessék (Dong és Liu, 2005). Az Akt fehérje számos olyan szubsztrát működését modulálja, melyek a sejt túlélési útvonalakat, a sejtciklust vagy a sejtek növekedését befolyásolják (Fresno Vara és mtsai., 2004). A kísérleteinkben alkalmazott PI3K blokkoló az Akt fehérje működésének gátlásán keresztül tehát többek között az antiapoptotikus mechanizmusokat is gátolta, így az ALC nem fejthette ki protektív hatását. Mindez abban nyilvánult meg, hogy a blokkoló jelenlétében az ALC a korábban már hatásosnak bizonyuló koncentrációban sem volt képes kivédeni a fEPSP-k végleges eltűnését. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban fellelhető adatokkal, miszerint az ALC a PI3K/Akt útvonal aktiválódását idézi elő (Abdul és Butterfield, 2007), vagyis ezáltal képes antiapoptotikus hatást is kifejteni (34. ábra).



34. ábra: Az ALC neuroprotektív hatása mögött húzóódó lehetséges, alternatív mechanizmus. A PI3K/Akt szignalizációs útvonal különböző sejtes folyamatok, közöttük az antiapoptotikus válaszok szabályozásában vesz részt. Az ischémia/reperfúziós sérülések során felszabaduló ROS a PI3K-t, ezáltal pedig az Akt szignalizációt gátolja, mely végső soron apoptotikus sejtpusztulást eredményez. Az ALC a PI3K/Akt útvonalat képes aktiválni, ami pedig az antiapoptotikus folyamatok beindulásához vezet. Rövidítések: ROS – reaktív oxigén gyökök, PI3K – foszfatidil-inozitol-3 kináz, ALC – acetil-L-karnitin, Akt=protein kináz-B, Bad – Bcl-2-asszociált halál promóter, Cit-c – citokróm C, HO-1 – hemoxigenáz-1, Hsp – hősokk fehérje (Abdul és Butterfield, 2007 nyomán módosítva).

Mindezek mellett egyéb hatásmechanizmusokat is feltártak az ALC neuroprotektív hatásával kapcsolatban, úgy mint hősokk fehérjék és a hemoxigenáz-1 indukálása (Abdul és Butterfield, 2007), a TNF α szintjének csökkentése (Ahmed, 2012), az idegi növekedési faktorok szintjének növelése és az idegrostok regenerálása (Karalija és mtsai., 2014), vagy akár a génexpresszió modulálása (Traina és mtsai., 2009), melyek közül akár több is szerepet játszhat a mi kísérleti felállásunkban kapott eredményekben is.

Az ALC-t a fent említett szerepei és hatásai alapján ma már nem csupán állatkísérletekben, hanem klinikai vizsgálatokban is alkalmazzák. Klinikai II-es fázisban a hatóanyagot tesztelték már többek között Alzheimer-kórban szenvedő pácienseknél (Remington és mtsai., 2015), krónikus hepatitis C (Malaguarnera és mtsai., 2014), súlyos

hepatikus encefalopátia (Malaguarnera és mtsai., 2011), alkoholfüggőség (Martinotti és mtsai., 2010), illetve depresszió esetén is (Wang és mtsai., 2014). A tanulmányokban minden esetben ígéretes eredményekről számoltak be. Mivel az ALC a szervezetben fiziológiás körülmények között is jelenlévő, endogén molekula, így a magasabb koncentrációban történő alkalmazására is lehetőség van anélkül, hogy súlyos mellékhatások jelentkeznének. A metabolikus útvonalak számára nagy energiájú acetyl csoportokat biztosít, ezáltal fokozza az agy általános energia állapotát, helyreállítja a mitokondriális funkciót, kivédi az oxidatív stressz által okozott károsodásokat, illetve antiapoptotikus hatással is rendelkezik. Mivel a fent említett betegségek esetén (és akár az ischemiás stroke-ot követően is) ezek a zavarok általánosan fennállnak, ezért az ALC alkalmazásának igen nagy jelentősége lehet a klinikai kezelések esetén is. A disszertáció alapját képező kísérletekben mind globális hipoperfúzió, mind pedig globális ischemia esetén kimutatható volt az ALC neuroprotektív hatása, mely a szinaptikus transzmisszió helyreállításában, a dendrittüskék megőrzésében, illetve a szinaptikus plaszticitásban manifestálódott. A növekvő számú tanulmányok egyre inkább megerősítik azt a nézetet, miszerint a neuroprotektív stratégiák sorában helyet kaphatnak azok a természetes hatóanyagok, melyeket táplálék kiegészítőként alkalmazva olyan mechanizmusok és szignalizációs útvonalak aktiválódhatnak, amelyek a neurodegeneratív sérülést mérsékelni, illetve kivédeni képesek.

Következtetések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka célja az ALC esetleges protektív hatásának vizsgálata volt különböző ischemiás modelleken. Az eredményeink tükrében a célkitűzésekben feltett kérdéseinkre az alábbi válaszokat adhatjuk, illetve az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- 1.) Az előkezelésben alkalmazott ALC a 2VO-s globális hipoperfúzió által előidézett funkcionális károsodásokat (az LTP sérülését) képes kivédeni. A protektív hatása az elektrofiziológiai vizsgálatok mellett hisztológiai módszerrel is kimutatható volt, hiszen az ischemiás inzultus következtében nagymértékben lecsökkent dendrittuske számot kontroll szintre állította vissza (a hippocampus CA1-es régiójában). Az első kísérletsorozat részeként azt is megállapítottuk, hogy az ALC utókezelésben történő alkalmazása nem fejt ki jelentős protektív hatást.**
- 2.) A molekula protektív hatását globális ischemiás modellen is sikerült kimutatnunk a hippocampus CA1-es régiójában. Az OGD által okozott szinaptikus transzmisszió-károsodást és sejtpusztulást dózis-függő módon védte ki. A kísérletsorozatban az 500 μ M-os koncentrációban alkalmazott ALC a 15 perces OGD hatására végleg megszűnő fEPSP-k teljes regenerációját eredményezte. Kísérleti felállásunkban – eddig egyedülálló módon – a regenerációt követő LTP indukálhatóságban is sikerült kimutatnunk a molekula jótékony hatását. A kezelésnek köszönhetően a nagyfrekvenciás ingerlés hatására bekövetkező potencírozódás stabilan fennmaradt a regisztrációs periódus végéig.**
- 3.) OGD-s globális ischemiás modellünkben vizsgálva az ALC lehetséges hatásmechanizmusát sikerült bebizonyítanunk, hogy az első két kísérletsorozatban kapott neuroprotektív hatás kialakulásában fontos szerepe van a PI3K/Akt jelátviteli útvonalnak.**

Kísérleteink alapján elmondható, hogy az ALC képes neuroprotektív hatást kifejteni az ischemiás inzultus során fellépő funkcionális és morfológiai károsodásokkal szemben. Eredményeink azt a nézetet is alátámasztották, miszerint az ALC csak előkezelésben alkalmazva mutat (jelentős) neuroprotektív hatást. Mivel ez egy endogén aminosav

származék, mely a szervezetben általánosan előfordul, még magasabb dózisban történő alkalmazása esetén sem kell elfogadhatatlan, súlyos mellékhatásokkal számolni. Ígéretes molekula lévén a jövőben helyet kaphat azon természetes hatóanyagok sorában, melyeket táplálékkiegészítőként preventív céllal alkalmazhatunk bizonyos betegségekkel és az általuk okozott károsodásokkal szemben.

Összefoglalás

Az ischemiás stroke a fejlett, iparosodott társadalmakban a vezető halálokok közé tartozik. Az inzultust túlélő páciensek az ischemia következtében fellépő szöveti károsodás miatt maradandó motoros és kognitív sérüléseket szenvedhetnek. Az ischémiát okozó okklúzió megszüntetésére a klinikai gyakorlatban a rekombináns szöveti plazminogén aktivátort (rt-PA) használják, ez azonban csupán a páciensek igen kis százalékánál alkalmazható. A tápanyag- és oxigénhiány következtében fellépő, maradandó szöveti és funkcionális elváltozások kezelése jelenleg nem megoldott probléma, bár a területen intenzív kísérletes kutatómunka folyik. A vizsgált stratégiák és hatóanyagok az állatkísérletek során gyakran ígéretesnek bizonyulnak, a klinikai próbálkozások során azonban ezek sorra elbuknak. Ezen ellentmondásos eredményeket számos faktor magyarázhatja, melyek között említhetjük a humán agy és az állatkísérletekben vizsgált, főként rágcsáló agyak közötti különbségeket, valamint azt, hogy a klinikai próbák során a páciensek általában később részesülnek a hatóanyag kezelésben a stroke-ot követően, mint ahogy azokat az állatkísérletekben tesztelték. Továbbá a még hatásosnak bizonyuló molekuláknál is gyakran jelentkezik dozírozási nehézség. Ezért az elmúlt évtizedben számos kutatócsoport figyelme olyan hatóanyagok felé fordult, melyek természetes módon is jelen vannak a szervezetben, így még magasabb dózisban való alkalmazásuk esetén sem kell súlyos mellékhatásokkal számolni, és a dozírozási nehézségek is elkerülhetők. Így kerültek a figyelem középpontjába az antioxidánsok (pl.: melatonin, rezveratrol, zöld tea), valamint a különböző metabolikus vegyületek (pl.: ALC, kreatin, Q10 koenzim) is.

Kísérleteink során az ALC esetleges protektív hatását vizsgáltuk globális hipoperfúzió, valamint *in vitro* globális ischemia esetén. A mérések során elektrofiziológiai úton teszteltük a molekula hatékonyságát az ischemiás inzultus által okozott funkcionális károsodásokkal szemben. A 2VO-val előidézett hipoperfúziós modellen végzett kísérletekben hisztológiai vizsgálatokkal kerestük az elektrofiziológiai mérések során kapott eredmények morfológiai alapját. Végül pedig a kísérletsorozatokban tapasztalt protektív hatás mögött húzódó útvonal feltérképezését végeztük. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz hippocampális agyszeleteket alkalmaztunk, ahol az ischémiára legérzékenyebb régióban (CA1) teszteltük a szinaptikus plaszticitást. A szinaptikus plaszticitás a neuronok között meglévő kapcsolatok aktivitásfüggő megváltozása, mely a tanulás és memória folyamatok alapját szolgáltatja. A felnőtt

gerinces idegrendszerben meglévő szinaptikus plaszticitás tanulmányozására egy általánosan alkalmazott modell a rágcsálók hippocampusa, amely a memória kialakulásában kulcsfontosságú struktúra. A hippocampus anatómiai sajátosságai (a neuronok szabályos rendezettsége, jól karakterizálható szinaptikus útvonalak) kifejezetten alkalmassá teszik ezt a struktúrát az elektrofiziológiai vizsgálatokra. Ilyen a magas frekvenciás ingerlés hatására bekövetkező hosszútávú potencírozódás, amely a szinapszisok megerősödésével és az áttevődés hatékonyságának fokozódásával jár. Az LTP képezi a memória kialakulásának neuronális alapját. Az LTP az elektrofiziológiai vizsgálatok során regisztrált fEPSP-k amplitúdójának, valamint meredekségének növekedésében nyilvánul meg. Mindezeknek a morfológiai alapját pedig a piramissejteken lévő dendrittüskék strukturális változásai (pl.: PSD kiterjedése, a spine-ok számának növekedése) adják. A spine-ok morfológiai változásai – és így a hozzájuk köthető funkcionális változások, úgymint az LTP – nem csak a normál agyi működések során alapvető fontosságúak, hanem a különböző neuropatológiás folyamatokban is. Így az LTP vizsgálatok, valamint a dendrittüskék kvantitatív analízise az ischemia során fellépő károsodások, és az ezzel szemben alkalmazott hatóanyagok tesztelésére egyaránt alkalmasak.

Az első kísérletsorozatban az ALC globális hipoperfúzióval szemben mutatott potenciális hatékonyságát vizsgáltuk. Az LTP mérések során azt tapasztaltuk, hogy a 2VO jelentős funkcionális károsodást okozott, mely a kontroll csoportéhoz képest alacsonyabb szintű LTP-ben nyilvánult meg. A kialakult potencírozódás mindemellett rendkívül instabil volt, egy folyamatosan csökkenő tendencia jellemezte, melynek eredményeként a fEPSP-k amplitúdói az LTP indukciót megelőző szintre estek vissza. Mivel az utókezelések az ischemiás stroke kezelése szempontjából nagyobb jelentőséggel rendelkeznek, ezért a hatóanyagot először az inzultus után alkalmazva (100 mg/kg-os dózisban) teszteltük. Az ALC utókezelés hatására az LTP indukciót követően már nagyobb mértékű potencírozódást tapasztaltunk, mint a 2VO-s csoportnál. Ezek az értékek azonban csak az első negyed órában voltak jellemzőek, ezután az amplitúdók egy enyhe csökkenést mutattak, majd egy alacsonyabb szinten stabilizálódtak. Mivel a dózis emelésével (200 mg/kg) sem sikerült javítanunk a károsodott LTP funkción, ezért előkezelésben (100 mg/kg) kezdtük vizsgálni a hatóanyagot. Ebben az esetben egyértelműen jelentkezett a protektív hatás, hiszen egy kontroll csoportéval megegyező mértékű, stabil potencírozódást sikerült indukálni. A kezeléseket ál-műtött állatokon is elvégeztük annak érdekében, hogy kizárjuk az ALC

szinaptikus transzmissziót és plaszticitást moduláló hatását. Ez esetben sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll csoport értékeitől. A hisztológiai vizsgálatok során kapott eredmények alátámasztották az elektrofiziológiai mérések során kapottakat, hiszen a 2VO hatására a dendrittüskék száma jelentősen lecsökkent a kontroll csoporthoz képest. Ezt az utókezelés nem tudta kivédeni, azonban az előkezelés esetén kontroll szintű tüske sűrűséget tapasztaltunk. Mindezen hisztológiai eredmények párhuzamba állíthatók az elektrofiziológiai vizsgálatok során regisztrált LTP funkciókkal.

Annak ellenére, hogy az *in vitro* ischemiás modellek számos jellemzőben különböznek az *in vivo* előidézett, illetve bekövetkező inzultustól, mégis a meglévő hasonlóságok alkalmassá teszik őket az ischemia, valamint a lehetséges protektív farmakonok vizsgálatára. Segítségükkel egy jól kontrollálható, egyszerű rendszerben követhetők nyomon azok az alapvető fontosságú, jól jellemezhető információk, melyek az oxigén és glükóz hiányára kialakuló sejtes válaszokat jellemzik. Ahhoz, hogy az OGD-s modellen tesztelhesük az ALC-t, először a vizsgálatainkhoz szükséges ischemiás inzultus időtartamát kellett meghatároznunk. A próbakísérletekben különböző időintervallumok alkalmazását követően megállapítottuk, hogy a mi kísérleti felállásunkban 15 perces OGD-t követően már nem térnek vissza a regisztrált fEPSP-k. Ebben a rendszerben egy potenciálisan neuroprotektív hatóanyagtól azt várjuk, hogy alkalmazásával az OGD-t követően a potenciálok ismét megjelennek. Ezen kísérletsorozatban nem csupán egy olyan effektív koncentrációt kerestünk, mely a fEPSP-k kontroll szintre való visszatérését eredményezi, hanem amely mindemellett egy stabil LTP kialakulását is lehetővé teszi. A 125 μM -os koncentrációban vizsgált ALC az esetek felében nem volt képes kivédeni az ischemia okozta sejtpusztulást, így a fEPSP-k sem tértek vissza az OGD-t követően. A regisztrátumok másik felénél már megjelentek a fEPSP-k, de ezek amplitúdója és slope-ja minden esetben jóval a kontroll értékek alatt maradt a követési periódus végéig. Ezen koncentráció esetén csupán két regisztrátumnál tapasztaltunk potencírozódást az LTP indukciót követően, de sajnos ez nem bizonyult stabilnak, az értékek a felvétel során folyamatosan csökkentek. A 250 μM -os dózis a fEPSP-k regisztrált értékeinek kontroll szintre történő visszatérése tekintetében hatásosnak bizonyult, azonban stabil LTP ez esetben sem jelentkezett. Az 500 μM -os koncentráció hatására az OGD utáni követési periódus végére a fEPSP-k amplitúdó és slope értékei elérték a kontroll szintet, továbbá az indukált LTP jóval magasabb szintű volt, mint a korábban alkalmazott, alacsonyabb dózisok esetén. Ez a potencírozódás stabilan fennmaradt a követési periódus végéig. A keresett

effektív koncentráció meghatározását követően az ALC hatása mögött húzódó mechanizmusokat kerestük. Ehhez egy PI3K blokkolót (LY294002) alkalmaztunk. A PI3K/Akt útvonal az egyik fő intracelluláris szignalizációs lehetőséget jelenti a különböző sejtes folyamatok szabályozásában, például a túlélési, antiapoptotikus folyamatok regulációjában. A blokkoló jelenlétében az ALC a korábban már hatásosnak bizonyuló (500 μ M-os) koncentrációban sem volt képes kivédeni a fEPSP-k végleges eltűnését, tehát a PI3K blokkoló az Akt fehérje működésének gátlásán keresztül többek között az antiapoptotikus mechanizmusokat is blokkolta, így az ALC nem fejthette ki protektív hatását. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban fellelhető adatokkal, miszerint az ALC a PI3K/Akt útvonal aktiválódását előidézve is képes neuroprotektív hatást kifejteni.

Mindezek mellett egyéb hatásmechanizmusokat is feltártak az ALC neuroprotektív hatásával kapcsolatban, úgymint hősokk fehérjék és a hemoxigenáz-1 indukálása, a TNF α szintjének csökkentése, az idegi növekedési faktorok szintjének növelése és az idegrostok regenerálása, az agyi energetika fokozása, alternatív Ac-Ko-A forrás biztosítása, a sejt- és a mitokondriális membrán integritásának megőrzése vagy akár a génexpresszió modulálása. Természetesen ezek közül akár több is szerepet játszhat a mi kísérleti felállásunkban kapott eredményekben is. Az ALC-t a fent említett szerepei és hatásai alapján ma már nem csupán állatkísérletekben, hanem klinikai vizsgálatokban is alkalmazzák. A klinikai II-es fázisban kapott eredményekről beszámoló tanulmányokban az ALC-t egy ígéretes hatóanyag jelölt molekulaként mutatják be. Előnyös tulajdonsága, hogy könnyen átjut a BBB-on, továbbá mivel a szervezetben endogén módon is jelen van, így a magasabb koncentrációban történő alkalmazására is lehetőség van anélkül, hogy mellékhatások jelentkeznének. A növekvő számú tanulmányok egyre inkább megerősítik azt a nézetet, miszerint a neuroprotektív stratégiák sorában helyet kaphatnak azok a természetes hatóanyagok, melyeket táplálék kiegészítőként alkalmazva olyan mechanizmusok és szignalizációs útvonalak aktiválódhatnak, amelyek a neurodegeneratív sérülést mérsékelni, illetve kivédeni képesek.

Summary

Ischemic stroke is one of the leading causes of death in the industrial countries. Survivors suffer from long-lasting and permanent damage (e.g. impaired motor and cognitive functions) caused by the harmful effects of ischemia on the brain tissues. In clinical practice, the recombinant tissue plasminogen activator is the only drug used for the treatment of acute ischemic stroke, but it can be applied in merely a few per cent of the patients. The treatment of the lasting tissue damage and functional impairment due to the lack of glucose and oxygen is currently an unsolved problem, despite the extensive research in this field. New strategies and compounds are often promising in animal studies, but most fail during the clinical trials. The differences between the human brain and the rodent brain studied experimentally could explain this inconsistency. Furthermore, in clinical practice patients usually receive the treatment much later than the time in experimental tests. Difficulties arise in the dosages of the studied molecules in many cases, and the attention of many researchers during the last decade has turned to compounds normally present in the human body, which can therefore be administered safely even in higher doses without serious side-effects. As a result, various antioxidants (e.g. melatonin, resveratrol and green tea) and metabolic compounds (e.g. acetyl-L-carnitine (ALC), creatine and coenzyme Q₁₀) have come into the focus of neuroprotection research.

We examined the potential protective effects of ALC against global hypoperfusion and *in vitro* global ischemia, testing its efficacy against the functional impairment caused by the ischemic insult with electrophysiological measurements. Our aim was to identify the morphological basis of the electrophysiological results of 2-vessel occlusion (2VO) global hypoperfusion experiments. We additionally focused on the mechanisms underlying the protective effect of ALC. For the electrophysiological measurements, hippocampal brain slices were used, where the synaptic plasticity was tested in the region (CA1) most vulnerable to ischemia. The process of experience-dependent changes in synaptic connectivity, synaptic plasticity, provides the basis of learning and memory. A model system widely used to study plasticity in the adult vertebrate nervous system involves the rodent hippocampus, a key element in memory formation. The anatomy of the hippocampus (the specified location and orientation of the neurons, the well-characterized synaptic pathways) renders it particularly suitable for electrophysiological investigations, e.g. long-term potentiation (LTP). High-

frequency stimulation results in LTP, which is associated with strengthening of the synapses and an increase in neural transmission. LTP provides the neuronal basis of memory formation, and also results in the increases in field excitatory postsynaptic potentiation (fEPSP) amplitudes and slopes during electrophysiological recordings. The structural changes in the dendritic spines of the pyramidal cells (e.g. increases in the postsynaptic density, increases in the number of the spines) provides the morphological basis of this potentiation. Morphological changes in the spines (and also the functional changes, including LTP) are important not only in normal brain functions, but also under different pathological circumstances. Measurement of the LTP and quantitative analysis of the dendritic spine number are suitable for investigating the harmful effects of ischemia and testing potential agents against the impairments.

We first measured the effects of ALC against global hypoperfusion. 2VO resulted in significant functional damage, manifested in lower LTP relative to the control group. This LTP was unstable, and displayed a constant decay over time. As a result, the amplitudes of the fEPSPs almost reached the level recorded before LTP induction. As concerns the relevance of the treatment of stroke patients in clinical practice, we tested the effects of ALC (100 mg/kg) administered after the ischemic insult. There was a higher potentiation after LTP induction relative to the 2VO group, but these amplitudes were stable only in the first 15 min, and then decayed slightly and stabilized on a lower level. Since increase of the dose (200 mg/kg) did not repair the impaired LTP function, we examined the effects of ALC pretreatment (100 mg/kg). Its protective action was clear, for the potentiation was the same as that of the control, and this LTP was stable until the end of the recording period. To exclude the modulating effect of ALC on the synaptic transmission and plasticity, we also administered the compound to sham-operated animals. There was no significant difference between the LTP of the control and that of the ALC-treated sham-operated group. The results of histological measurements were in accordance with the electrophysiological ones; in the 2VO group, the number of dendritic spines was significantly decreased relative to the control, but whereas the post-treatment was not effective against this decrease, in the pretreated group the level of the spines was the same as in the control. These histological results parallel the LTP functions measured during the electrophysiological recordings.

Despite the differences between *in vitro* and *in vivo* ischemia models, there are many similarities, which makes *in vitro* models suitable for the measurement of ischemia and the

testing of potential protective agents. *In vitro* models provide well-controlled, simple systems, where the cellular responses against ischemic injury can be detected and characterized. To test the effects of ALC on an oxygen-glucose deprivation (OGD) model, we first determined the suitable time for the ischemic insult in our system. The preliminary studies revealed that the fEPSPs did not appear after a 15-min OGD. In this case, we presumed that a potential neuroprotective drug could restore the fEPSPs after the ischemic insult. Our aim was to identify the lowest effective concentration which could restore the fEPSPs to the control level, and which also provided the possibility of the induction and maintenance of stable LTP. In the 125 μ M ALC-treated group, half of the cases demonstrated definite elimination of the fEPSPs, so the treatment did not prevent the damage and cell death caused by ischemia. In the other half of this experimental group, the fEPSPs appeared after OGD, but the increases in the amplitudes and the slopes were low, and they saturated below the control level. LTP was induced in only two recordings, but was not stable, exhibiting a constant decay. The application of 250 μ M ALC was effective, since the fEPSPs returned to the control level after OGD. On the other hand, this concentration was not sufficiently high to induce stable LTP. In the 500 μ M ALC-treated group, the amplitudes and slopes of the fEPSPs reached the control level, and after the high-frequency stimulation there was a higher potentiation than in the 125 and 250 μ M ALC-treated groups. Furthermore, this LTP was stable until the end of the recordings. Having found this effective concentration, we set out to identify the mechanisms underlying the protective effect of ALC. A phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (LY294002) was applied in these experiments. The PI3K/Akt pathway is one of the main intracellular signalizations in the regulation of the different intracellular processes (e.g. the regulation of the survival and antiapoptotic processes). In the presence of this inhibitor, the effective ALC concentration (500 μ M) did not prevent the loss of the fEPSPs after OGD. LY294002 presumably blocked the antiapoptotic mechanisms through inhibition of the Akt protein, and thus ALC could not be protective. Our results are in accordance with the findings of other research groups that ALC can be neuroprotective through activation of the PI3K/Akt pathway.

However, there are a number of other mechanisms underlying the neuroprotective effect of ALC, including the induction of heat-shock proteins and hemoxygenase-1, reduction of the level of tumor necrosis factor- α , increase of the level of the nerve growth factors, regeneration of the nerve fibers, improvement of the brain energetics, provision of an

alternative acetyl-coenzyme A source, preservation of the cellular and mitochondrial membrane integrity and gene expression modulation. It is possible that several of these processes can simultaneously underly the protective effect of ALC revealed in our experiments. Because of these roles and effects of ALC, it is not only used in animal studies, but also tested in preclinical trials, and has proved very promising. ALC has many beneficial features, including its ready ability to cross the blood-brain barrier; moreover, since it is an endogenous molecule, it can be applied in higher concentration without serious side-effects or toxicity. The number of studies relating to the neuroprotective effects of different natural substances is currently increasing steadily. These compounds can be applied as dietary supplements and can act as neuroprotectants in various neurodegenerative diseases. They may perhaps offer an alternative and effective mode of clinical treatment (e.g. as supplementary treatment) of these diseases in the future.

Irodalomjegyzék

1. Abdul HM, Butterfield DA. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb 1;42(3):371-84. PubMed PMID: 17210450. Pubmed Central PMCID: 1808543.
2. Ahmed HH. Modulatory effects of vitamin E, acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid on new potential biomarkers for Alzheimer's disease in rat model. *Exp Toxicol Pathol*. 2012 Sep;64(6):549-56. PubMed PMID: 21183322.
3. Albertini P, Amenta F, Bossoni G, Cavallotti C, Felici L, Ferrante F, et al. Effect of acetyl-L-carnitine treatment on the density of muscarinic receptors in the brain of methylazoxymethanol-microencephalic rats. *Drugs Exp Clin Res*. 1989;15(9):421-7. PubMed PMID: 2483545.
4. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Omar FA, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Shabanah OA. Carnitine esters prevent oxidative stress damage and energy depletion following transient forebrain ischaemia in the rat hippocampus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Aug;33(8):725-33. PubMed PMID: 16895547.
5. Ames BN, Liu J. Delaying the mitochondrial decay of aging with acetylcarnitine. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;1033:108-16. PubMed PMID: 15591008.
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):7915-22. PubMed PMID: 8367443. Pubmed Central PMCID: 47258.
7. Ando S, Tadenuma T, Tanaka Y, Fukui F, Kobayashi S, Ohashi Y, et al. Enhancement of learning capacity and cholinergic synaptic function by carnitine in aging rats. *J Neurosci Res*. 2001 Oct 15;66(2):266-71. PubMed PMID: 11592123.
8. Bagetta V, Barone I, Ghiglieri V, Di Filippo M, Sgobio C, Bernardi G, et al. Acetyl-L-Carnitine selectively prevents post-ischemic LTP via a possible action on mitochondrial energy metabolism. *Neuropharmacology*. 2008 Aug;55(2):223-9. PubMed PMID: 18590920.
9. Barbour B, Szatkowski M, Ingledew N, Attwell D. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature*. 1989 Dec 21-28;342(6252):918-20. PubMed PMID: 2512508.
10. Barria A, Derkach V, Soderling T. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):32727-30. PubMed PMID: 9407043.
11. Bauer M, Pfennig A, Severus E, Whybrow PC, Angst J, Moller HJ, et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, part 1: update 2013 on the acute and continuation treatment of unipolar depressive disorders. *World J Biol Psychiatry*. 2013 Jul;14(5):334-85. PubMed PMID: 23879318.

12. Beal CC. Gender and stroke symptoms: a review of the current literature. *J Neurosci Nurs.* 2010 Apr;42(2):80-7. PubMed PMID: 20422793.
13. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:261-83. PubMed PMID: 3052273.
14. Bird MI, Munday LA, Saggerson ED, Clark JB. Carnitine acyltransferase activities in rat brain mitochondria. Bimodal distribution, kinetic constants, regulation by malonyl-CoA and developmental pattern. *Biochem J.* 1985 Feb 15;226(1):323-30. PubMed PMID: 3977877. Pubmed Central PMCID: 1144709.
15. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993 Jan 7;361(6407):31-9. PubMed PMID: 8421494.
16. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973 Jul;232(2):331-56. PubMed PMID: 4727084. Pubmed Central PMCID: 1350458.
17. Blitzer RD, Gil O, Landau EM. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1990 Nov 13;119(2):207-10. PubMed PMID: 2280895.
18. Bogaert YE, Rosenthal RE, Fiskum G. Postischemic inhibition of cerebral cortex pyruvate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med.* 1994 Jun;16(6):811-20. PubMed PMID: 8070685.
19. Borum PR. Carnitine. *Annu Rev Nutr.* 1983;3:233-59. PubMed PMID: 6357236.
20. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev.* 1983 Oct;63(4):1420-80. PubMed PMID: 6361812.
21. Brenningstall GN. Carnitine deficiency syndromes. *Pediatr Neurol.* 1990 Mar-Apr;6(2):75-81. PubMed PMID: 2187442.
22. Bresolin N, Freddo L, Vergani L, Angelini C. Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function. *Exp Neurol.* 1982 Nov;78(2):285-92. PubMed PMID: 7140898.
23. Brown CE, Li P, Boyd JD, Delaney KR, Murphy TH. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci.* 2007 Apr 11;27(15):4101-9. PubMed PMID: 17428988.
24. Buchs PA, Muller D. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 23;93(15):8040-5. PubMed PMID: 8755599. Pubmed Central PMCID: 38871.
25. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1655-7. PubMed PMID: 12040186.
26. Caplan L, 2000. *Caplan's Stroke. A Clinical Approach.* Butterworth Heinemann.
27. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005 Apr;51(4):745-52. PubMed PMID: 15708951.
28. Cerio FG, Lara-Celador I, Alvarez A, Hilario E. Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci.* 2013;3(1):191-214. PubMed PMID: 24961314. Pubmed Central PMCID: 4061821.

29. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*. 2010 Aug;91(4):313-48. PubMed PMID: 20438797.
30. Chen ZM, Sandercock P, Pan HC, Counsell C, Collins R, Liu LS, et al. Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke : A combined analysis of 40 000 randomized patients from the chinese acute stroke trial and the international stroke trial. On behalf of the CAST and IST collaborative groups. *Stroke*. 2000 Jun;31(6):1240-9. PubMed PMID: 10835439.
31. Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta*. 2002 Jan;315(1-2):99-110. PubMed PMID: 11728413.
32. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. 1983 Jan;334:33-46. PubMed PMID: 6306230. Pubmed Central PMCID: 1197298.
33. Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann SF. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1864-9. PubMed PMID: 12052960.
34. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jun 1;38(11):1433-44. PubMed PMID: 15890617.
35. Crepel V, Hammond C, Chinestra P, Diabira D, Ben-Ari Y. A selective LTP of NMDA receptor-mediated currents induced by anoxia in CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1993 Nov;70(5):2045-55. PubMed PMID: 8294969.
36. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Calvani M, Nicolai R, Mosconi L, Toscano A, et al. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on neuropathic pain and apoptosis: a role for the nicotinic receptor. *J Neurosci Res*. 2009 Jan;87(1):200-7. PubMed PMID: 18709658.
37. Di Cesare Mannelli L, Vivoli E, Salvicchi A, Schiavone N, Koverech A, Messano M, et al. Antidepressant-like effect of artemin in mice: a mechanism for acetyl-L-carnitine activity on depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Nov;218(2):347-56. PubMed PMID: 21590285.
38. Di Filippo M, Tozzi A, Costa C, Belcastro V, Tantucci M, Picconi B, et al. Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharmacology*. 2008 Sep;55(3):353-62. PubMed PMID: 18359495.
39. Dolezal A, Soukup K, Vinsova N, Sklenickova R, Dubska R. [Is hypoxia of the fetus always accompanied by precocious expulsion of meconium? (author's transl)]. *Sb Lek*. 1981;83(11-12):359-62. PubMed PMID: 7323669. Je vždy hypoxie plodu spojená s predčasným vypuzením smolky?
40. Dong LQ, Liu F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Aug;289(2):E187-96. PubMed PMID: 16014356.

41. Donnan GA¹, Davis SM, Parsons MW, Ma H, Dewey HM, Howells DW. How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Nat Rev Neurol*. 2011 Jun 14;7(7):400-9. doi: 10.1038/nrneurol.2011.89.
42. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008 Sep;55(3):310-8. PubMed PMID: 18308346. Pubmed Central PMCID: 2603601.
43. Ebert D, Haller RG, Walton ME. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5928-35. PubMed PMID: 12843297.
44. Edvinsson L, Krause DN. *Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2002. Lippincott Williams and Wilkins.
45. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007 Apr;54(1):162-80. PubMed PMID: 17296232.
46. Farrell S, Vogel J, Bieber LL. Entry of acetyl-L-carnitine into biosynthetic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Mar 21;876(1):175-7. PubMed PMID: 3081044.
47. Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*. 2002 Jun;39(1):29-54. PubMed PMID: 12086707.
48. Forloni G, Angeretti N, Smiroldo S. Neuroprotective activity of acetyl-L-carnitine: studies in vitro. *J Neurosci Res*. 1994 Jan;37(1):92-6. PubMed PMID: 7908343.
49. French EW, Fraenkel G. Carnitine (vitamin B t) as a nutritional requirement for the confused flour beetle. *Nature*. 1954 Jan 23;173(4395):173. PubMed PMID: 13132899.
50. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004 Apr;30(2):193-204. PubMed PMID: 15023437.
51. Fukuchi T, Katayama Y, Kamiya T, McKee A, Kashiwagi F, Terashi A. The effect of duration of cerebral ischemia on brain pyruvate dehydrogenase activity, energy metabolites, and blood flow during reperfusion in gerbil brain. *Brain Res*. 1998 May 4;792(1):59-65. PubMed PMID: 9593822.
52. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods*. 1998 Jan 31;79(1):1-4. PubMed PMID: 9531453.
53. Glaser EM, Van der Loos H. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*. 1981 Aug;4(2):117-25. PubMed PMID: 6168870.
54. Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 1998 Aug 10;801(1-2):1-8. PubMed PMID: 9729236.
55. Gonzalez RG. Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain". *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006 Apr;27(4):728-35. PubMed PMID: 16611754.

56. Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat.* 1959 Oct;93:420-33. PubMed PMID: 13829103. Pubmed Central PMCID: 1244535.
57. Gross CJ, Henderson LM, Savaiano DA. Uptake of L-carnitine, D-carnitine and acetyl-L-carnitine by isolated guinea-pig enterocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1986 May 29;886(3):425-33. PubMed PMID: 3708005.
58. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):372-85. PubMed PMID: 14962470.
59. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar;84(2-3):153-66. PubMed PMID: 12022946.
60. Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:181-203. PubMed PMID: 10989667.
61. Halliwell B: Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* (2006) 97(6):1634-1658.
62. Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci.* 1992 Jul;12(7):2685-705. PubMed PMID: 1613552.
63. Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:341-71. PubMed PMID: 8210179.
64. Hart AM, Wiberg M, Youle M, Terenghi G. Systemic acetyl-L-carnitine eliminates sensory neuronal loss after peripheral axotomy: a new clinical approach in the management of peripheral nerve trauma. *Exp Brain Res.* 2002 Jul;145(2):182-9. PubMed PMID: 12110958.
65. Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, Goldberg MP. Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci.* 2001 Apr 1;21(7):2393-403. PubMed PMID: 11264313.
66. Heifets BD, Castillo PE. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:283-306. PubMed PMID: 19575681.
67. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6. PubMed PMID: 11048727.
68. Ho VM, Lee JA, Martin KC. The cell biology of synaptic plasticity. *Science.* 2011 Nov 4;334(6056):623-8. PubMed PMID: 22053042. Pubmed Central PMCID: 3286636.
69. Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Sep;10(9):647-58. PubMed PMID: 19693029.
70. Hoppel CL, Genuth SM. Urinary excretion of acetylcarnitine during human diabetic and fasting ketosis. *Am J Physiol.* 1982 Aug;243(2):E168-72. PubMed PMID: 6810706.

71. Hsu CY. Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. 1998. Karger.
72. Huang FP, Wang ZQ, Wu DC, Schielke GP, Sun Y, Yang GY. Early NF κ B activation is inhibited during focal cerebral ischemia in interleukin-1 β -converting enzyme deficient mice. *J Neurosci Res*. 2003 Sep 1;73(5):698-707. PubMed PMID: 12929137.
73. Hulsmann WC. Biochemical profile of propionyl-L-carnitine. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991 Feb;5 Suppl 1:7-9. PubMed PMID: 2031874.
74. Inano A, Sai Y, Nikaido H, Hasimoto N, Asano M, Tsuji A, et al. Acetyl-L-carnitine permeability across the blood-brain barrier and involvement of carnitine transporter OCTN2. *Biopharm Drug Dispos*. 2003 Nov;24(8):357-65. PubMed PMID: 14595704.
75. Irikura K, Morii S, Miyasaka Y, Yamada M, Tokiwa K, Yada K. Impaired autoregulation in an experimental model of chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Stroke*. 1996 Aug;27(8):1399-404. PubMed PMID: 8711809.
76. Iwasaki K, Kitamura Y, Ohgami Y, Mishima K, Fujiwara M. The disruption of spatial cognition and changes in brain amino acid, monoamine and acetylcholine in rats with transient cerebral ischemia. *Brain Res*. 1996 Feb 19;709(2):163-72. PubMed PMID: 8833752.
77. Jahan R, Vinuela F. Treatment of acute ischemic stroke: intravenous and endovascular therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2009 Apr;7(4):375-87. PubMed PMID: 19379062.
78. Januszewicz E, Bekisz M, Mozrzymas JW, Nalecz KA. High affinity carnitine transporters from OCTN family in neural cells. *Neurochem Res*. 2010 May;35(5):743-8. PubMed PMID: 20143157.
79. Januszewicz E, Pajak B, Gajkowska B, Samluk L, Djavadian RL, Hinton BT, et al. Organic cation/carnitine transporter OCTN3 is present in astrocytes and is up-regulated by peroxisome proliferators-activator receptor agonist. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Dec;41(12):2599-609. PubMed PMID: 19735737.
80. Jia H, Zhang XM, Zhang BA, Liu Y, Li JM. Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci*. 2012 Oct;33(5):1063-70. PubMed PMID: 22218811.
81. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res*. 2010 Jan;49(1):61-75. PubMed PMID: 19720082.
82. Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*. 2002 Apr 15;22(8):3108-16. PubMed PMID: 11943814.
83. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*. 1982 Oct 29;218(4571):433-43. PubMed PMID: 6289442.
84. Karalija A, Novikova LN, Kingham PJ, Wiberg M, Novikov LN. Neuroprotective effects of N-acetyl-cysteine and acetyl-L-carnitine after spinal cord injury in adult rats. *PLoS One*. 2012;7(7):e41086. PubMed PMID: 22815926. Pubmed Central PMCID: 3398872.

85. Karalija A, Novikova LN, Kingham PJ, Wiberg M, Novikov LN. The effects of N-acetyl-cysteine and acetyl-L-carnitine on neural survival, neuroinflammation and regeneration following spinal cord injury. *Neuroscience*. 2014 Jun 6;269:143-51. PubMed PMID: 24680856.
86. Kennedy MB. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*. 2000 Oct 27;290(5492):750-4. PubMed PMID: 11052931.
87. Kerner J, Hoppel C. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr*. 1998;18:179-206. PubMed PMID: 9706223.
88. Kido Y, Tamai I, Ohnari A, Sai Y, Kagami T, Nezu J, et al. Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2001 Dec;79(5):959-69. PubMed PMID: 11739607.
89. Kimura S, Amemiya F. Brain and liver pathology in a patient with carnitine deficiency. *Brain Dev*. 1990;12(4):436-9. PubMed PMID: 2240466.
90. Kirov SA, Harris KM. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. *Nat Neurosci*. 1999 Oct;2(10):878-83. PubMed PMID: 10491607.
91. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. 2007 Apr 1;74(1):29-38. PubMed PMID: 17188668.
92. Kobayashi S, Iwamoto M, Kon K, Waki H, Ando S, Tanaka Y. Acetyl-L-carnitine improves aged brain function. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Jul;10 Suppl 1:S99-106. PubMed PMID: 20590847.
93. Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol*. 2007 Feb;81(3):179-96. PubMed PMID: 17267093.
94. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):99-163. PubMed PMID: 17237344.
95. Kuratsune H, Watanabe Y, Yamaguti K, Jacobsson G, Takahashi M, Machii T, et al. High uptake of [2-11C]acetyl-L-carnitine into the brain: a PET study. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 13;231(2):488-93. PubMed PMID: 9070306.
96. Lai KO, Ip NY. Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr Opin Neurobiol*. 2009 Jun;19(3):275-83. PubMed PMID: 19497733.
97. Legos JJ, Barone FC. Update on pharmacological strategies for stroke: prevention, acute intervention and regeneration. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Jul;4(7):847-58. PubMed PMID: 14619407.
98. Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci*. 2000 Jun;3(6):545-50. PubMed PMID: 10816309.
99. Malaguarnera G, Pennisi M, Gagliano C, Vacante M, Malaguarnera M, Salomone S, et al. Acetyl-L-Carnitine Supplementation During HCV Therapy With Pegylated Interferon-alpha 2b Plus Ribavirin: Effect on Work Performance; A Randomized

- Clinical Trial. *Hepat Mon.* 2014 May;14(5):e11608. PubMed PMID: 24910702. Pubmed Central PMCID: 4030263.
100. Malaguarnera M, Vacante M, Motta M, Giordano M, Malaguarnera G, Bella R, et al. Acetyl-L-carnitine improves cognitive functions in severe hepatic encephalopathy: a randomized and controlled clinical trial. *Metab Brain Dis.* 2011 Dec;26(4):281-9. PubMed PMID: 21870121.
 101. Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, et al. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 1989 Aug 17;340(6234):554-7. PubMed PMID: 2549423.
 102. Malinow R, Schulman H, Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science.* 1989 Aug 25;245(4920):862-6. PubMed PMID: 2549638.
 103. Marosi M, Fuzik J, Nagy D, Rakos G, Kis Z, Vecsei L, et al. Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion. *Eur J Pharmacol.* 2009 Feb 14;604(1-3):51-7. PubMed PMID: 19135048.
 104. Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2005 Jan 1-15;79(1-2):240-7. PubMed PMID: 15562436. Pubmed Central PMCID: 2570320.
 105. Martinotti G, Reina D, Di Nicola M, Andreoli S, Tedeschi D, Ortolani I, et al. Acetyl-L-carnitine for alcohol craving and relapse prevention in anhedonic alcoholics: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Alcohol Alcohol.* 2010 Sep-Oct;45(5):449-55. PubMed PMID: 20595193.
 106. Marzo A, Arrigoni Martelli E, Urso R, Rocchetti M, Rizza V, Kelly JG. Metabolism and disposition of intravenously administered acetyl-L-carnitine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;37(1):59-63. PubMed PMID: 2591464.
 107. McBean DE, Kelly PA. Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol.* 1998 Apr;30(4):431-4. PubMed PMID: 9522158.
 108. Mehrotra A, Sandhir R. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behav Brain Res.* 2014 Mar 15;261:345-55. PubMed PMID: 24393741.
 109. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007 Apr;54(1):34-66. PubMed PMID: 17222914.
 110. Messe SR, Fonarow GC, Smith EE, Kaltenbach L, Olson DM, Kasner SE, et al. Use of tissue-type plasminogen activator before and after publication of the European Cooperative Acute Stroke Study III in Get With The Guidelines-Stroke. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2012 May;5(3):321-6. PubMed PMID: 22550132.
 111. Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res.* 2001 Jan;49(1):125-9. PubMed PMID: 11134502.

112. Miecz D, Januszewicz E, Czeredys M, Hinton BT, Berezowski V, Cecchelli R, et al. Localization of organic cation/carnitine transporter (OCTN2) in cells forming the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(1):113-23. PubMed PMID: 17995936.
113. Minkler PE, Stoll MS, Ingalls ST, Yang S, Kerner J, Hoppel CL. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008 Sep;54(9):1451-62. PubMed PMID: 18678604.
114. Mitchell ME. Carnitine metabolism in human subjects. I. Normal metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1978 Feb;31(2):293-306. PubMed PMID: 341684.
115. Mori K, Yoshioka M, Suda N, Togashi H, Matsumoto M, Ueno K, et al. An incomplete cerebral ischemia produced a delayed dysfunction in the rat hippocampal system. *Brain Res*. 1998 Jun 8;795(1-2):221-6. PubMed PMID: 9622637.
116. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986 Feb 27-Mar 5;319(6056):774-6. PubMed PMID: 2869411.
117. Murray V, Norrving B, Sandercock PA, Terent A, Wardlaw JM, Wester P. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke. *J Intern Med*. 2010 Feb;267(2):191-208. PubMed PMID: 20175866.
118. Nagy D, Kocsis K, Fuzik J, Marosi M, Kis Z, Teichberg VI, et al. Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: onset-dependent second pathophysiological stress. *Neuropharmacology*. 2011 Oct-Nov;61(5-6):1026-32. PubMed PMID: 21781978.
119. Nalecz KA, Miecz D, Berezowski V, Cecchelli R. Carnitine: transport and physiological functions in the brain. *Mol Aspects Med*. 2004 Oct-Dec;25(5-6):551-67. PubMed PMID: 15363641.
120. NIH Office of Dietary Supplements (2012) Dietary supplements: what you need to know NIH Office Dietary Supplements Web site. ods.od.nih.gov/HealthInformation/DS_WhatYouNeedToKnow.aspx.
121. Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*. 2001 Jul 15;21(14):5139-46. PubMed PMID: 11438589.
122. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;88(24):11285-9. PubMed PMID: 1684863. Pubmed Central PMCID: 53119.
123. Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*. 1997 Aug;79(4):1039-50. PubMed PMID: 9219966.
124. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969 May 9;164(3880):719-21. PubMed PMID: 5778021.

125. Ori C, Freo U, Pizzolato G, Dam M. Effects of acetyl-L-carnitine on regional cerebral glucose metabolism in awake rats. *Brain Res.* 2002 Oct 4;951(2):330-5. PubMed PMID: 12270513.
126. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 Apr;30(4):266-72. PubMed PMID: 12680845.
127. Panter RA, Mudd JB. Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett.* 1969 Oct 21;5(2):169-70. PubMed PMID: 11947268.
128. Park HG, Kim SH, Kwon SH, Ju YG, Yang JK, Baek JH, et al. Electrically driven single-cell photonic crystal laser. *Science.* 2004 Sep 3;305(5689):1444-7. PubMed PMID: 15353796.
129. Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry.* 1998 Mar 1;43(5):315-9. PubMed PMID: 9513745.
130. Pettegrew JW, Levine J, McClure RJ. Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Mol Psychiatry.* 2000 Nov;5(6):616-32. PubMed PMID: 11126392.
131. Picconi B, Barone I, Pisani A, Nicolai R, Benatti P, Bernardi G, et al. Acetyl-L-carnitine protects striatal neurons against in vitro ischemia: the role of endogenous acetylcholine. *Neuropharmacology.* 2006 Jun;50(8):917-23. PubMed PMID: 16500685.
132. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Jan;33(1):88-109. PubMed PMID: 17851537.
133. Potula R, Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Chrastil J, Heilman D, et al. Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune responses in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol.* 2006 Apr;168(4):1335-44. PubMed PMID: 16565506. Pubmed Central PMCID: 1606563.
134. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Mar 9;1546(1):21-43. PubMed PMID: 11257506.
135. Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec;25(5-6):475-93. PubMed PMID: 15363637.
136. Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Jun 5;630(1):22-9. PubMed PMID: 6770910.
137. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Nov;1033:30-41. PubMed PMID: 15591001.

138. Reed LJ. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation-dephosphorylation cycle. *Curr Top Cell Regul.* 1981;18:95-106. PubMed PMID: 7273851.
139. Remington R, Bechtel C, Larsen D, Samar A, Doshanj L, Fishman P, et al. A Phase II Randomized Clinical Trial of a Nutritional Formulation for Cognition and Mood in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25589719.
140. Ricciolini R, Scalibastri M, Kelleher JK, Carminati P, Calvani M, Arduini A. Role of acetyl-L-carnitine in rat brain lipogenesis: implications for polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Neurochem.* 1998 Dec;71(6):2510-7. PubMed PMID: 9832150.
141. Riikonen J, Jaatinen P, Rintala J, Porsti I, Karjala K, Hervonen A. Intermittent ethanol exposure increases the number of cerebellar microglia. *Alcohol Alcohol.* 2002 Sep-Oct;37(5):421-6. PubMed PMID: 12217931.
142. Robertson CL, Scafidi S, McKenna MC, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2009 Aug;218(2):371-80. PubMed PMID: 19427308. Pubmed Central PMCID: 3096876.
143. Robinson AM, Williamson DH. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 1980 Jan;60(1):143-87. PubMed PMID: 6986618.
144. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012 Jan 3;125(1):e2-e220. PubMed PMID: 22179539.
145. Ronaldson PT, Davis TP. Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia. *Pharmacol Rev.* 2013 Jan;65(1):291-314. PubMed PMID: 23343976. Pubmed Central PMCID: 3565919.
146. Rosca MG, Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the elderly: Is acetylcarnitine a rejuvenator? *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Nov 30;61(14):1332-42. PubMed PMID: 19720100. Pubmed Central PMCID: 4120470.
147. Rosenthal RE, Williams R, Bogaert YE, Getson PR, Fiskum G. Prevention of postischemic canine neurological injury through potentiation of brain energy metabolism by acetyl-L-carnitine. *Stroke.* 1992 Sep;23(9):1312-7; discussion 7-8. PubMed PMID: 1519288.
148. Rump TJ, Abdul Muneer PM, Szlachetka AM, Lamb A, Haorei C, Alikunju S, et al. Acetyl-L-carnitine protects neuronal function from alcohol-induced oxidative damage in the brain. *Free Radic Biol Med.* 2010 Nov 30;49(10):1494-504. PubMed PMID: 20708681. Pubmed Central PMCID: 3022478.
149. Sacktor TC. How does PKMzeta maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci.* 2011 Jan;12(1):9-15. PubMed PMID: 21119699.
150. Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, et al. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature.* 1995 Jan 12;373(6510):151-5. PubMed PMID: 7816096.

151. Scafidi S, Racz J, Hazelton J, McKenna MC, Fiskum G. Neuroprotection by acetyl-L-carnitine after traumatic injury to the immature rat brain. *Dev Neurosci*. 2010;32(5-6):480-7. PubMed PMID: 21228558. Pubmed Central PMCID: 3073762.
152. Schmidt-Sommerfeld E, Penn D. Carnitine and total parenteral nutrition of the neonate. *Biol Neonate*. 1990;58 Suppl 1:81-8. PubMed PMID: 2124931.
153. Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*. 1994 Dec;55(2):195-203. PubMed PMID: 7530260.
154. Shankaran S. Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. *J Neurotrauma*. 2009 Mar;26(3):437-43. PubMed PMID: 19281415. Pubmed Central PMCID: 2828322.
155. Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*. 2007 Aug 17;317(5840):951-3. PubMed PMID: 17702943.
156. Shuaib A, Waqaar T, Wishart T, Kanthan R, Howlett W. Acetyl-L-carnitine attenuates neuronal damage in gerbils with transient forebrain ischemia only when given before the insult. *Neurochem Res*. 1995 Sep;20(9):1021-5. PubMed PMID: 8570005.
157. Shug AL, Schmidt MJ, Golden GT, Fariello RG. The distribution and role of carnitine in the mammalian brain. *Life Sci*. 1982 Dec 20;31(25):2869-74. PubMed PMID: 7162355.
158. Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med*. 2009;1:7. PubMed PMID: 20150985. Pubmed Central PMCID: 2820445.
159. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1802(1):80-91. PubMed PMID: 19751827.
160. Sims NR. Calcium, energy metabolism and the development of selective neuronal loss following short-term cerebral ischemia. *Metab Brain Dis*. 1995 Sep;10(3):191-217. PubMed PMID: 8830281.
161. Stanley CA. New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv Pediatr*. 1987;34:59-88. PubMed PMID: 3318304.
162. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem*. 2002 Oct;83(1):220-8. PubMed PMID: 12358746.
163. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*. 1998 Oct;56(2):149-71. PubMed PMID: 9760699.
164. Strong AJ, Smith SE, Whittington DJ, Meldrum BS, Parsons AA, Krupinski J, et al. Factors influencing the frequency of fluorescence transients as markers of peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000 Jan;31(1):214-22. PubMed PMID: 10625740.
165. Taoufik E, Probert L. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des*. 2008;14(33):3565-73. PubMed PMID: 19075733.

166. Ten VS, Starkov A. Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol Res Int.* 2012;2012:542976. PubMed PMID: 22548167. Pubmed Central PMCID: 3323863.
167. Thompson BJ, Ronaldson PT. Drug delivery to the ischemic brain. *Adv Pharmacol.* 2014;71:165-202. PubMed PMID: 25307217. Pubmed Central PMCID: 4281266.
168. Tolu P, Masi F, Leggio B, Scheggi S, Tagliamonte A, De Montis MG, et al. Effects of long-term acetyl-L-carnitine administration in rats: I. increased dopamine output in mesocorticolimbic areas and protection toward acute stress exposure. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Sep;27(3):410-20. PubMed PMID: 12225698.
169. Traina G, Federighi G, Brunelli M, Scuri R. Cytoprotective effect of acetyl-L-carnitine evidenced by analysis of gene expression in the rat brain. *Mol Neurobiol.* 2009 Apr;39(2):101-6. PubMed PMID: 19199082.
170. van der Sluijs P, Hoogenraad CC. New insights in endosomal dynamics and AMPA receptor trafficking. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Jul;22(5):499-505. PubMed PMID: 21843653.
171. Virmani A, Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec;25(5-6):533-49. PubMed PMID: 15363640.
172. Virmani A, Pinto L, Binienda Z, Ali S. Food, nutrigenomics, and neurodegeneration--neuroprotection by what you eat! *Mol Neurobiol.* 2013 Oct;48(2):353-62. PubMed PMID: 23813102.
173. Virmani MA, Conti R, Spadoni A, Rossi S, Arrigoni-Martelli E. L-carnitine uptake into primary rat cortical cultures: interaction with GABA. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Aug;25(1-2):105-12. PubMed PMID: 7984034.
174. Virmani MA, Rossi S, Conti R, Spadoni A, Arrigoni-Martelli E, Calvani M. Structural, metabolic and ionic requirements for the uptake of L-carnitine by primary rat cortical cells. *Pharmacol Res.* 1996 Jan;33(1):19-27. PubMed PMID: 8817642.
175. Wang SM, Han C, Lee SJ, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. A review of current evidence for acetyl-L-carnitine in the treatment of depression. *J Psychiatr Res.* 2014 Jun;53:30-7. PubMed PMID: 24607292.
176. Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, et al. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):535-48. PubMed PMID: 18984164. Pubmed Central PMCID: 2585749.
177. Wawrzenczyk A, Sacher A, Mac M, Nalecz MJ, Nalecz KA. Transport of L-carnitine in isolated cerebral cortex neurons. *Eur J Biochem.* 2001 Apr;268(7):2091-8. PubMed PMID: 11277932.
178. Wong M. Modulation of dendritic spines in epilepsy: cellular mechanisms and functional implications. *Epilepsy Behav.* 2005 Dec;7(4):569-77. PubMed PMID: 16246628.
179. Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke.

- Mol Neurodegener. 2011;6(1):11. PubMed PMID: 21266064. Pubmed Central PMCID: 3037909.
180. Woolsey TA, Rovainen CM, Cox SB, Henegar MH, Liang GE, Liu D, et al. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cereb Cortex*. 1996 Sep-Oct;6(5):647-60. PubMed PMID: 8921201.
 181. World Health Organization Global Infobase. <http://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx>
 182. World Heart Federation. <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/stroke/>
 183. Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, Leibach FH, et al. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Sep;290(3):1482-92. PubMed PMID: 10454528.
 184. Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci*. 2011 May 18;31(20):7477-85. PubMed PMID: 21593331.
 185. Xu S, Waddell J, Zhu W, Shi D, Marshall AD, McKenna MC, et al. In vivo longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy on neonatal hypoxic-ischemic rat brain injury: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine. *Magn Reson Med*. 2014 Dec 2. PubMed PMID: 25461739.
 186. Yakel JL. Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflugers Arch*. 2013 Apr;465(4):441-50. PubMed PMID: 23307081. Pubmed Central PMCID: 3633680.
 187. Yasui F, Matsugo S, Ishibashi M, Kajita T, Ezashi Y, Oomura Y, et al. Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett*. 2002 Dec 16;334(3):177-80. PubMed PMID: 12453624.
 188. Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):469-77. PubMed PMID: 19137430. Pubmed Central PMCID: 2745337.
 189. Zaidan E, Sheu KF, Sims NR. The pyruvate dehydrogenase complex is partially inactivated during early recirculation following short-term forebrain ischemia in rats. *J Neurochem*. 1998 Jan;70(1):233-41. PubMed PMID: 9422367.
 190. Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Shaalan AA. Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Jan;100(3):347-60. PubMed PMID: 21958946.
 191. Zanelli SA, Solenski NJ, Rosenthal RE, Fiskum G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Aug;1053:153-61. PubMed PMID: 16179519.
 192. Zaremba J, Skrobanski P, Losy J. Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the

- volume of evolving brain infarct. *Biomed Pharmacother.* 2001 Jun;55(5):258-63. PubMed PMID: 11428551.
193. Zhang R, Zhang H, Zhang Z, Wang T, Niu J, Cui D, et al. Neuroprotective effects of pre-treatment with l-carnitine and acetyl-L-carnitine on ischemic injury in vivo and in vitro. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):2078-90. PubMed PMID: 22408439. Pubmed Central PMCID: 3292008.
194. Zhang S, Boyd J, Delaney K, Murphy TH. Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci.* 2005 Jun 1;25(22):5333-8. PubMed PMID: 15930381.
195. Zhang S, Murphy TH. Imaging the impact of cortical microcirculation on synaptic structure and sensory-evoked hemodynamic responses in vivo. *PLoS Biol.* 2007 May;5(5):e119. PubMed PMID: 17456007. Pubmed Central PMCID: 1854912.
196. Zhou P, Chen Z, Zhao N, Liu D, Guo ZY, Tan L, et al. Acetyl-L-carnitine attenuates homocysteine-induced Alzheimer-like histopathological and behavioral abnormalities. *Rejuvenation Res.* 2011 Dec;14(6):669-79. PubMed PMID: 21978079.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Toldi József Professzor Úrnak, hogy már szakdolgozó éveimben bizalmat szavazott és lehetőséget biztosított arra, hogy a kutatócsoportjához csatlakozzak. Szakmai észrevételei, tudományos útmutatása és erkölcsi támogatása nélkülözhetetlenek voltak az értekezés elkészítéséhez. Köszönöm Dr. Farkas Tamásnak, hogy munkám során minden lehetséges segítséget megadott. Köszönöm a munkatársaimnak, különösképpen Knapp Leventének a kísérletes munkák során nyújtott segítséget.

Külön köszönet illeti családomat, elsősorban Édesanyámat, hogy taníttatott, biztosította a tanulmányaim elvégzéséhez szükséges nyugodt háttérrel, valamint, hogy mindvégig mellettem állt és kitartásra ösztönzött.

Köszönöm valamennyi tanszéki munkatársnak a páratlan, barátságos légkört. Külön köszönöm Veketyné Várad Margitnak a hosszú évek során nyújtott technikai segítségét. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm barátaim bátorító szavait és támogatását.

Tudományos közlemények listája

Kocsis Kitti MTMT azonosító: 10029888

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Journal of Neural Transmission (Epub ahead of print) (DOI 10.1007/s00702-014-1343-7)
IF: 2,871

Acetyl-L-carnitine and oxaloacetate in post-treatment against LTP impairment in a rat ischemia model. An in vitro electrophysiological study.

Kocsis K, Knapp L, Mészáros J, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J

Neuroscience (2014 Jun 6;269:265-72. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.055.)
IF: 3,327

Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired LTP and spine density in a rat model of global ischaemia

Kocsis K, Knapp L, Gellért L, Oláh G, Kis Z, Takakuwa H, Iwamori N, Ono E, Toldi J and Farkas T

Egyéb közlemények:

Cellular and Molecular Neurobiology (2015 Jan;35(1):17-22. doi: 10.1007/s10571-014-0064-7)

IF.: 2,201

Neuroprotective effect of oxaloacetate in focal brain ischemic model in the rat

Knapp L, Gellért L, **Kocsis K**, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J

Neuropathology and Applied Neurobiology (2014 Aug;40(5):603-9.
doi:10.1111/nan.12069.)

IF.: 4,970

A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischaemia in the rat.

Knapp L, Gellért L, Herédi J, **Kocsis K**, Oláh G, Fuzik J, Kis Z, Vécsei L, Toldi J and Farkas T,

Neuroscience Letters. (2013 Oct 11;553:138-41. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.028.)

IF: 2,055

Paradox effects of kynurenes on LTP induction in the Wistar rat. An in vivo study

Demeter I, Nagy K, Farkas T, Kis Z, **Kocsis K**, Knapp L, Gellert L, Fülöp F, Vecsei L, Toldi J

Neuroscience (2013 Jan 3;228:371-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.042.)

IF: 3,327

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

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

Drug design and development (2013 Sep 16;7:981-7. doi: 10.2147/DDDT.S44496.)

IF:3,026

Influence of endogenous and synthetic NMDA receptor antagonists on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability changes

G Oláh, J Herédi, Á Menyhárt, Z Czinege, D Nagy, J Fuzik, **K Kocsis**, Knapp L, E Krucsó, L Gellért, Z Kis, T Farkas, F Fülöp, Á Párdutz, J Tajti, L Vécsei, J Toldi

Neuroscience (2013 Sep 5;247:95-101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.063.)

IF: 3,327

Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion

L Gellért, Knapp L, K Németh, J Herédi, D Varga, G Oláh, **K Kocsis**, Á Menyhárt, Z Kis, T Farkas, L Vécsei, J Toldi

Neuropharmacology. 2011 Oct-Nov; 61(5-6):1026-32

IF: 4.819

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.