

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

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

**Különböző neuroprotektív lehetőségek
tanulmányozása ischaemiás patkány
modelleken**

Ph.D. értekezés

Nagy Dávid

Témavezetők:

Dr. Farkas Tamás
egyetemi docens

Dr. Kis Zsolt
egyetemi adjunktus

2010
Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	6
<i>Az agyat érintő ischaemiás állapotok.....</i>	6
<i>A glutamát szerepe az apoptózisban.....</i>	10
<i>A kórosan megemelkedett glutamát szint csökkentésének lehetősége</i>	13
<i>Pre- kontra poszt kondicionálás</i>	18
<i>A kainát receptorok szerepe az idegrendszerben</i>	22
<i>A fokális ischaemia modell és az alkalmazott vizsgálati módszerek rövid bemutatása</i>	24
<i>A globális hipoperfúziós modell és az alkalmazott vizsgálati módszerek rövid bemutatása</i>	26
Célkitűzések	31
Anyagok és módszerek.....	32
<i>Felhasznált állatok:</i>	32
<i>Fokális ischaemia modell:.....</i>	32
<i>Kísérleti állatcsoportok a fokális ischaemia modellben:</i>	32
<i>Fototrombotikus lézió:</i>	33
<i>In vivo elektrofiziológia:</i>	34
<i>Szövettan, Fluoro-Jade B festés:</i>	37
<i>Oxálecetsav kezelés:.....</i>	38
<i>Alkalmazott statisztikai módszerek:.....</i>	39
<i>Globális hipoperfúziós modell:</i>	40
<i>Kísérleti állatcsoportok a globális hipoperfúziós modellben:.....</i>	40
<i>Kétoldali carotis communis okklúzió (2VO) az in vitro elektrofiziológiához és szövettanhoz:</i>	42
<i>In vitro elektrofiziológia:.....</i>	43
<i>Golgi-Cox festés:</i>	45
<i>Kvantitatív analízis:</i>	47
<i>Kainsav kezelés:</i>	47
<i>Alkalmazott statisztikai módszerek:.....</i>	48
Eredmények.....	49
<i>A fokális ischaemia modell kísérletsorozatainak eredményei</i>	49
<i>In vivo elektrofiziológia:</i>	49
<i>Hisztológia:</i>	53
<i>A globális hipoperfúziós modell kísérletsorozatainak eredményei</i>	57

<i>In vitro</i> elektrofiziológia:.....	57
<i>LTP</i> indukálhatóság:	57
Az alapvető szinaptikus jeltovábbítás vizsgálata:	61
<i>Morfológia</i> :	63
Diszkusszió.....	65
Összefoglaló.....	73
Summary	76
Köszönetnyilvánítás	79
Irodalomjegyzék.....	80
Tudományos közlemények jegyzéke.....	98
Mellékletek.....	101

Rövidítések jegyzéke

2VO: a két arteria carotis communis leztorítása (two vessel occlusion)
4VO: 4 ér elzárás - a két arteria carotis communis és a két arteria vertebralis elzárása (four-vessel occlusion)
aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AHA: Amerikai Szív Egyesület (American Heart Association)
ALS: amyotrophias lateral sclerosis
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-methylisoxasole-4-propionát
ATP: adenzin-trifoszfát
BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)
BCB: vér-cerebrospinális-gát (blood-cerebrospinal fluid-barrel)
CA1: Cornu Ammon 1-es régió
CA3: Cornu Ammon 3-es régió
CAT: kataláz
CBF: agyi véráramlás (cerebral blood flow)
CCA: arteria carotis communis (common carotid artery)
CIA: krónikus ischaemiás állapot (chronic ischaemic attack)
CREB: cAMP respond element binding
CSF: cerebrospinális folyadék
DW: desztillált víz (distilled water)
EAAT: excitatórikus aminosav transzporterek (excitatory aminoacid transporter)
EPSP: serkentő posztzinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potencial)
fEPSP: serkentő posztzinaptikus mező potenciál (excitatory postsynaptic potencial)
FJB: Fluoro-Jade B
GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
GF: növekedési faktor (growth factor)
Glu: glutamát
GOT: glutamát-oxáletecetsav transzamináz
GPT: glutamát-piruvát-transzamináz
H₂O₂: hidrogén-peroxid
HFS: nagy frekvenciás ingerlés (High Frequency Stimulation)
i.v.: intravénás
ICAM-1: sejten belüli adhéziós molekula-1 (inter-cellular adhesion molecule-1)
IL-1 β : interleukin-1 β
IO: bemenet/kimenet (input/output)
ISF: intersticiális folyadék (interstitial fluid)
KA: kainsav
KAR: kainát receptorok
KV: kiváltott válasz
LTP: szinaptikus áttevődés tartós megnövekedése (long-term potentiation)
MAPK: mitogén-aktiválta protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
MCAO: középső agyi artéria elzárás (middle-cerebral artery occlusion)
mRNS: messenger-ribonukleinsav
NMDA: N-metil-D-aszpartát
NOS: nitrogén-monoxid-szintetáz
nPr: nucleus principalis

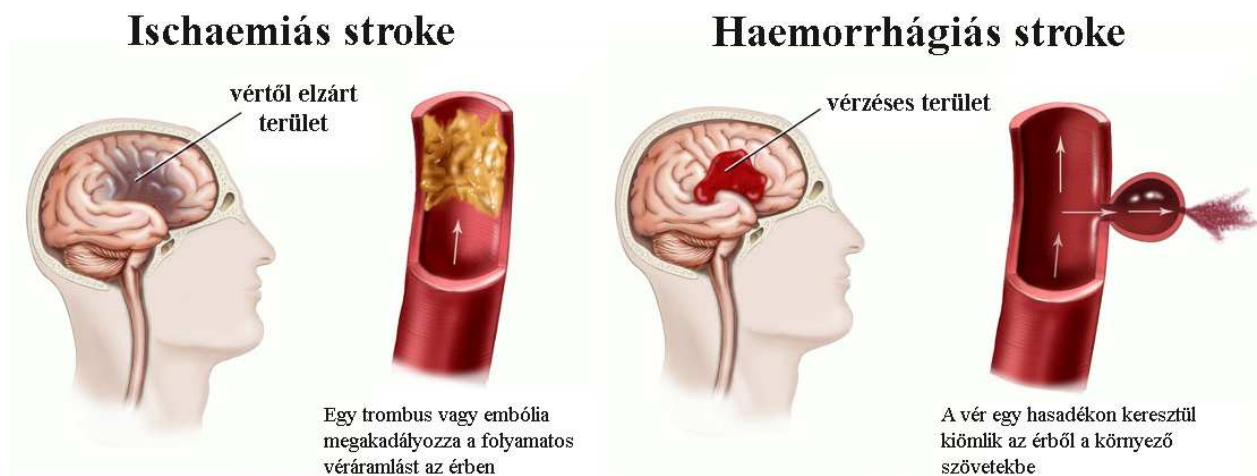
OGD: oxigén-glükóz-megvonás (oxygen-glucose-deprivation)
OxAc: oxálcetsav (oxaloacetate)
PBS: foszfát-puffer oldat (phosphate-buffer solution)
PKA/C: Protein Kináz A/Protein Kináz C
PLA2: foszfolipáz-A2
PM: *punctum maximum*
Po: posterior nucleus
Pr5: principális nucleus
PSD: posztzinaptikus denzitás
PTP: poszt-tetanikus potencírozódás (post-tetanic potentiation)
SEPs: szomatoszenzoros kiváltott válaszok (somatosensory evoked potentials)
snC: subnucleus caudalis
snI: subnucleus interpolaris
snO: subnucleus oralis
SOD: szuperoxid-dizmutáz
SSI: elsődleges szomatoszenzoros kéreg
TBS: theta-burst ingerlés (theta-burst stimulation)
TC: talamo-kortikális
TIA: transient ischaemic attack
TNF α : tumor-nekrózis faktor- α
VPM: a talamusz ventrális postero-mediális magja
WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

Bevezetés

Az agyat érintő ischaemiás állapotok

Hazánkban és világszerte egyaránt, a szív-, érrendszeri és a daganatos megbetegedések mellett a cerebrovasculáris és neurodegeneratív betegségek, valamint ezek következményei vezetnek a halálozási statisztikákat. Az idegrendszert érintő betegségek közül leggyakrabban átmeneti vagy tartós vérellátási zavar alakul ki, amelyet összefoglaló néven agyér-katasztrófának (stroke, szélütés) nevezünk. A fejlett, motorizált társadalmakban a gyermekek és fiatal felnőttek esetében a baleseti fejsérülés, mint halálozási ok szintén előkelő helyen áll (Zador és mtsai., 2004; Büki, 2006). A legnagyobb veszélynek a közlekedésben részt vevő kerékpárosok és gyalogosok, valamint az építkezéseken dolgozó munkások vannak kitéve. A balesetek által okozott fejsérülések közvetlen vagy közvetett következményeként szintén gyakran előfordul traumás ischaemiás állapot az agyban. Az egészségügyi világszervezet (WHO) 2010-es becslései szerint 2020-ra a szívbetegségek és a stroke lesznek világszerte a vezető okok úgy a halálozás, mint a rokkantság területén. Az előrejelzések azt mutatják, hogy 2020-ra a halálos kimenetelű események száma 20 millió fölé fog emelkedni, ugyanakkor 2030-ra várhatóan több mint évi 24 millió ember fogja az életét veszíteni e betegségek következtében. Jelenleg évente 1,4 millió ember hal meg agyér-katasztrófa következtében. Magyarországon évente 42 ezer ember szenved szélütést, ebből 14 ezren veszítik életüket azonnal. A túlélők közel 24%-át még az első esztendőben elveszítjük, míg további 5%-uk a második évben távozik az élők sorából. Még a stroke után életben maradtak sem biztosan élhetnek teljes életet, hiszen az esetek több mint 60%-ában valamilyen mértékű kognitív leépülés mutatható ki. A stroke így a rokkantságok egy tekintélyes hányadáért is felelős. A betegek 22%-a járásképtelen, 25-50%-a részben vagy teljesen mások segítségére szorul, hozzávetőlegesen 15%-a beszédzavarban szenved, és több mint 30%-a pedig depresszióssá válik (A Magyar Stroke Társaság adatai; 2010). Mivel az idegrendszert ért negatív hatások ilyen előkelő helyen állnak a halálozási okok között, valószínűleg ennek is szerepe volt abban, hogy a '90-es éveket az agy évtizedének (decade of the brain) nyilvánították, és ezekben az években az idegtudományok korábban nem látott fejlődésének lehettünk a tanúi (Zador és mtsai., 2004). Az elmúlt évtizedek új terápiás stratégiáinak köszönhetően az akut stroke ma már a sürgősségi ellátás körébe tartozik.

Az emberi agy a normális, zavartalan működéséhez a teljes vérkeringés egynegyedét használja fel. Ha az agyi véráramlás (CBF) valamilyen oknál fogva korlátozott, és a normálérték körülbelül 40%-a alá esik, akkor az oxigén és tápanyag ellátás csökkenése már oly mértékű energiahiányhoz vezet, amelynek következtében az idegi elektromos aktivitás zavara alakul ki, és neurológiai tünetek jelentkeznek (Zador és mtsai., 2004). Ha a vérellátás rövid időn belül helyreáll, átmeneti ischaemiás eseményről (TIA), ha azonban tartósan fennáll, akkor krónikus ischaemiás állapotról (CIA) beszélünk. Ezen utóbbi állapotra a leggyakoribb példa az artéria carotis communisokat érintő érelmeszesedés (atherosclerosis), amely a véredények beszűkülése által csökkenti az agyat ellátó vér mennyiségét (globális hipoperfúzió). A vérellátás zavarának helye és mértéke meghatározza azt, hogy helyi (fokális), vagy generalizált (globális) agyi funkcionális zavar, vagy súlyos esetben teljes funkcióvesztés alakul ki (National, 2005; Sauerbeck, 2006). Az agyér-katasztrófák közül a legnagyobb gyakorisággal azok az esetek fordulnak elő, amelyekben az agyat ellátó valamelyik véredényben egy vérrög (trombus) vagy embólia által akadályozott a véráramlás. Ez az esetek 80-85%-át teszi ki, és ischaemiás stroke-nak nevezzük (Bonita, 1992; Sudlow és Warlow, 1997; Rosamond és mtsai., 2007). A fennmaradó 15-20%-ba az úgynevezett vérzéses vagy haemorrhágiás stroke események tartoznak (Kidwell és Warach, 2003) (1. ábra).



1.ábra Az agyér-katasztrófák típusai és kialakulásuk okai

Saver, (2006)-ban közölt kalkulációi szerint egy átlagos ischaemiás stroke során másodpercenként 32 000 neuront, 230 millió szinapszist és 200 m mielin-hüvellyel borított idegsejt nyúlványt veszíthetünk el az érintett agyterületen, amely, becslések szerint megfelel 36 év alatt történő normál öregedés során kialakuló változásnak. A közvetlen következményeken és a kedvezőtlen mortalitási mutatókon túl további problémát jelent az, hogy neurológiai és pszichiátriai betegségek alakulhatnak ki az átmeneti vagy tartós vérellátási zavarok hatására. Az ischaemia az egyik kiváltó oka lehet a degeneratív dementiák kialakulásának is (Zlokovic, 2005).

A stroke-on átesett páciensek hatalmas terhet rónak a társadalomra, a betegellátó rendszerre és az érintettek családjára is. Mivel a betegség nagy arányban okoz tartósan rokkantságot, munkaképtelenséget, a hosszú távú kezelés költségei illetve az egyéb költségek (segédeszköz, rokkantsági nyugdíj, ápoló családtag stb.) csak becsülhetők. A rendelkezésre álló nemzetközi adatok szerint az USA-ban az akut ischaemiás stroke-beteg akut ellátásának költségei 10 000 USD körül vannak, míg a beteg haláláig az egészségügyi ellátás, rehabilitáció költségei, a beteg kiesett jövedelme, a hozzátartozók ápolási költségeinek együttes összege eléri a 90 000 USD-t (Taylor és mtsai., 1996; Horner, 1998). A fenti összegek európai adatok szerint 6-12 000 USD illetve 60-70 000 USD körül mozognak (Jorgensen és mtsai., 1999).

Az USA-ban a stroke ellátásra költött összeg hozzávetőlegesen 30 milliárd dollár, amely az indirekt költségeket is beleszámítva elérheti a 43 milliárd dollárt (White és mtsai., 2000). A cerebrovasculáris betegségek kezelési költségei 25 Európai uniós tagállamra vonatkoztatva 2003-ban 21 milliárd euró volt (Leal és mtsai., 2006). A fejlett országok egészségügyi kiadásainak kb. 5%-át teszik ki a stroke ellátás költségei (Horner, 1998).

Hazánkban a stroke betegek átlagéletkora 5-10 évvel alacsonyabb, mint a fejlett ipari országokban. Magyarországon, a nyugati országokhoz képest, rendkívül magas a stroke okozta mortalitás/morbiditás az 50 évnél fiatalabbak populációjában. Amíg az EU országokban az akut stroke betegek mortalitása az 50 év alatti korcsoportban 8-10/100 000, addig ez a szám hazánkban a nők esetében 40/100 000, férfiaknál 60/100 000 (Nagy és mtsai., 2000). A közel 9000 beteg adatainak feldolgozása alapján készült Stroke Adatbázis (Nagy és mtsai., 2000), valamint a GYÓGYINFOK adatai szerint, a stroke okozta halálozás az elmúlt években Magyarországon elérte a 180/100 000-et. Az évi 50 000 agyi érbetegség miatti kórházi felvétel közül, mindössze 8-10 000 történik az akut szakban. A stroke központban ellátott akut ischaemiás stroke beteg konzervatív kezelésének költsége - az AOK

költségszámítási adatai alapján- átlagosan 380 000 Ft, a kezelés első 14 napjára vetítve. Az akutan elvégzett trombolízis ezt az összeget körülbelül a kétszeresére növeli.

Fontos megemlíteni azt, hogy az agyi vérellátás zavara nem csak agyér-katasztrófa során alakulhat ki. Számos baleset vagy betegség során kialakuló szívmegeállás következményeként is megszűnik teljesen az agy vérellátása. Észak-Amerikában és Európában is az újraélesztések száma évente megközelíti a fél milliót (Bottiger és mtsai., 1999; Peberdy és mtsai., 2003; Eckstein és mtsai., 2005), ebből körülbelül 70 000 eset kapcsolható infarktushoz. A szívmegeállás globális agyi ischaemiát okoz, ugyanakkor az agy pedig extrém érzékenységet mutat a hypoxiás állapotokra. Jó példa erre az, hogy a páciens már 5-6 másodperces ischaemia esetén elveszíti eszméletét (Rossen és mtsai., 1943). Az újraélesztést követően bekövetkező halálozások legfőbb oka az agyat érintő kiterjedt idegi sérülés, amely a szívmegeállás következtében kialakuló globális agyi ischaemia következménye (Krause és mtsai., 1986; Laver és mtsai., 2004). Az újraélesztés után életben maradó személyek körülbelül fele tartós kognitív-funkció károsodást szenved, amely az összpontosítási képesség romlását vagy akár memória kiesést is jelenthet (Lim és mtsai., 2004; van Alem és mtsai., 2004). Ezen pácienseknek mindössze 5-10%-a képes teljes mértékben visszatérni a korábbi életviteléhez (Krause és mtsai., 1986). Ezek után érthető, hogy miért olyan fontos a spontán keringés mihamarabb történő visszaállítása az ischaemiás események bekövetkezése után.

Az elmúlt években, évtizedekben az ischaemiás állapotokat követő agykárosodás mechanizmusait egyre mélyebben sikerült megismerni a világszerte széles körben folyó kutatásoknak köszönhetően. Mivel a fokális agyi ischaemia pathomechanizmusára vonatkozó ismereteink is rohamosan bővültek (Farkas és mtsai., 2002; Sarti és mtsai., 2002; Farkas és mtsai., 2004; Zlokovic, 2005), mind a prevencióban, mind a terápiában ígéretes eredmények születtek az állatkísérletes modellekben. A vizsgálatokból azonban az is kiderült, hogy az ischaemiát követő idegrendszeri károsodások mérséklése vagy megakadályozása nagyon összetett feladat, amely egyetlen támadásponton hatva valószínűleg nem valósítható meg. Ezt támasztotta alá a humán klinikai vizsgálatokról érkező sorozatos kudarcok híre is (Hoyte és mtsai., 2004). Ezért további igény mutatkozik új farmakonok kipróbálására, valamint alternatív neuroprotektív stratégiák kidolgozására, amelyek a klinikumban is használhatóak lesznek.

A fokális ischaemiát követő idegrendszeri rendellenességek vagy sérülések esetében, az érintett agyterület a nekrotikus központi magra (core) és az azt köpenyszerűen körülvevő penumbrára különül (Hermann és mtsai., 1999; Plesnila és mtsai., 2003; Hermann és mtsai.,

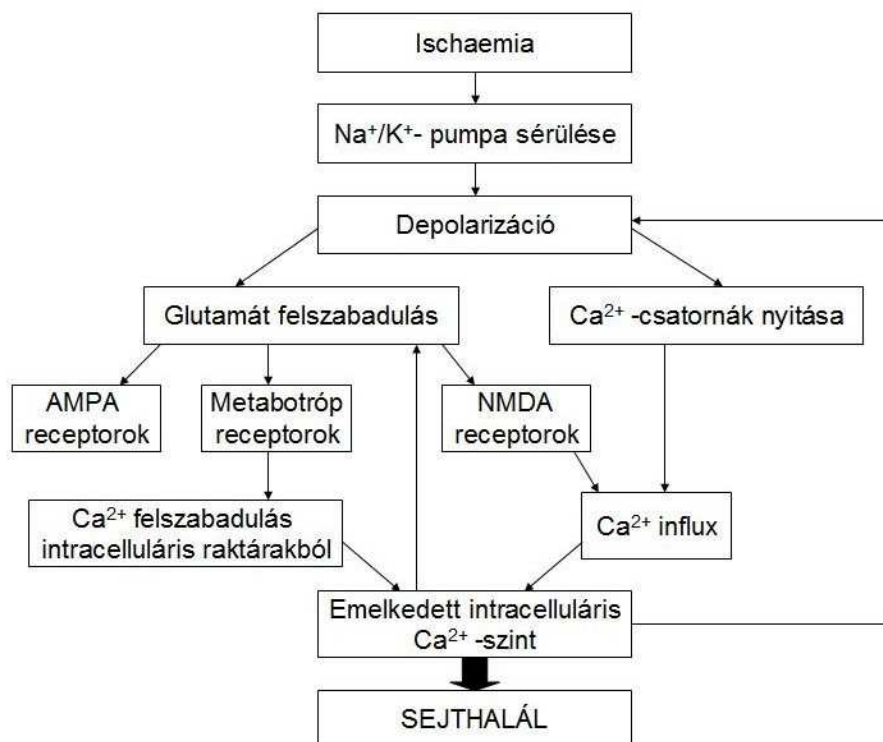
2004). A core régióba eső sejtek nekrotizálódnak, amely folyamat a sejtek irreverzibilis károsodását, gyors és kiterjedt pusztulását jelenti, amelyet reaktív leukocytainfiltráció vesz körül, és hegesedés követ. A penumbra régió lecsökkent vérellátását a helyi kollaterális-áramlás biztosítja, így ennek állapota nagyban meghatározza a károsodás mértékét. A penumbra vérellátása a letális energiaelégtelenség és az elektromos elégtelenség között ingadozik, ezáltal az adott terület működése kiesik, de még potenciálisan megmenthető, ha az agyi vérátáramlás ismét normalizálódik (Zádor és mtsai., 2003). Idővel azonban a penumbra területén található idegsejtek is belecsúszhatnak az irreverzibilis károsodásba. Az agyi véráramlás csökkenése molekuláris események sorát, az úgynevezett ischaemiás kaszkádot indítja be (Tsuchiya és mtsai., 1992). Ezen kaszkád eredményeként az adott sejtek apoptózis révén elpusztulnak. Az apoptózis egy genetikailag szabályozott sejtpusztulás, amelyet a patológiás körülmények indíthatnak el a szükségesnél korábban. Az agyi vérellátási zavarokban jelentkező apoptózist elsődlegesen az oxigén-, szubsztráthiány és a következményes ATP-csökkenés indítja el (Suzuki és mtsai., 1998). A csak kis mértékben csökkent áramlás (low flow) egészséges agyszövetben sem funkcionális, sem morfológiai változást nem okoz, mert a csökkent oxigénkínálat különböző mechanizmusokkal kompenzálható. A funkciókárosodás egy határig reverzibilis, azonban adott áramlási érték alatt (irreverzibilis áramlási küszöb) olyan mértékűvé válik, ami már visszafordíthatatlan membránkárosodást és egyéb morfológiai elváltozást, végül a sejtek pusztulását okozza (Jones és mtsai., 1981). Ha a hypoxia következtében jelentkező ATP-hiány szubletális mértékű, a döntési fázissal megkezdődik az apoptózis eseménysora, amely a penumbra területére lokalizálódik. Ha azonban az ATP csökkent mennyisége átlép egy bizonyos határt, nem apoptózist, hanem nekrozist indukál (Nicotera és mtsai., 2000; Zádor és mtsai., 2003).

A glutamát szerepe az apoptózisban

Közismert, hogy a glutamát (Glu) a legfőbb serkentő neurotranszmitter a központi idegrendszerben, amely számos fiziológiai folyamatban vesz részt, de kiemelt szerepet játszik a patológiás excitotoxicitás kialakulásában is, amelynek során a kórosan megemelkedett Glu szint károsítja és elpusztítja az idegsejteket (Choi, 1988; Choi, 1994).

Az apoptózis kezdeti eseménysorában döntő a Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának emelkedése. A Ca^{2+} -nak az extracelluláris térből az idegsejtekbe jutásában három mechanizmus játszik szerepet: 1. az ATP-hiány miatt jelentkező, az aktív Ca^{2+} pumpához

kötött transzportjelenség; 2. a Na^+/K^+ -ATP-áz csökkent működése sejtmembrán-depolarizációt okoz, ezáltal feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák nyílnak meg; 3. az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav (AMPA), majd az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú Glu receptorokkal rendelkező ionszatornák nyílnak meg (Jatzke és mtsai., 2002). Ezen kívül két endogén Ca^{2+} raktár is megnyílik: az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium (White és mtsai., 2000). A Ca^{2+} szintjének folyamatos emelkedése fokozott Glu felszabadulást okoz az axonterminálisokban, megváltoztatva a posztzinaptikus sejtek működését, ezáltal szöveti szintre emeli az apoptózis következményeit. A megemelkedett ionkoncentráció az idegsejtben több Ca^{2+} -függő enzimet is aktivál. Ilyen például a foszfolipáz-A2 (PLA2), amely a lipidmembrán közvetlen lízisét eredményezi (Mattson és mtsai., 2000), valamint a nitrogén-oxid-szintáz (NOS), ami nitrogén-oxid és peroxi-nitrit képzése útján okoz lipid-peroxidációt (Kruman és mtsai., 1997; Zádor és mtsai., 2003). Az eddigi folyamatokból világosan kiderül a Glu fontos szerepe az apoptózis kezdeti szakaszában és annak továbbterjedésében (2. ábra).

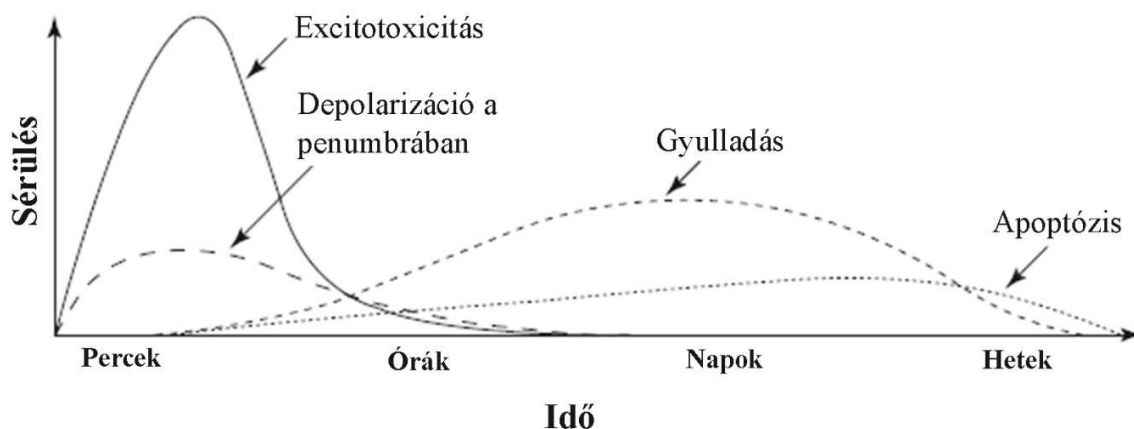


2. ábra Az ischaemiát követő molekuláris mechanizmusok vázlata, amelyek végül sejthalálhoz vezetnek (Lyden és Wahlgren, 2000).

Az apoptózis terjedése szerepet játszik például a távolabbi neuronok károsodásában (Zhang és mtsai., 1998), az agyi ischaemiában (Garcia-Galloway és mtsai., 2003), a Huntington-kórban (Storey és mtsai., 1992) és az epilepsziás rohamok kialakulásában is (Dingledine és mtsai., 1990). A megzavart Ca^{2+} homeosztázis kulcsszerepet játszik számos neurodegeneratív elváltozás kialakításában is, mint például az Alzheimer-kór és az Amyotrophias Lateral Sclerosis (ALS) (Celsis és mtsai., 1987; Yoshida és mtsai., 1988; de la Torre, 1999; Karhunen és mtsai., 2005).

A krónikusan fennálló lokális hypoxia, károsodott glükózmétabolizmust és anaerob glikolízist indukál, ami laktátszint-növekedést és acidózist von maga után (Pulsinelli és mtsai., 1982; Beck és mtsai., 1995; Derdeyn és mtsai., 1999). A vasculáris és neurodegeneratív háttérű patológiai folyamatokban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a gliasejtek megváltozásának is (Wakita és mtsai., 1994; Rudolphi és Schubert, 1997). A fizioiógias körülmények között stabil, nyugvó mikroglia sejtek ischaemia hatására aktiválódnak és neurotoxikus anyagokat (proteázok, nitrogén-monoxid, oxigén-szabadgyökök, citokinek, interferonok) szabadítanak fel. Ezek az anyagok a neuronokat károsítva azok halálához vezethetnek. Az ischaemia, a neurodegeneratív folyamatok, illetve a keletkező citokinek hatására a nyugvó asztrociták szintén aktivált állapotba kerülnek. A folyamat következtében elveszítik az ion homeosztázist fenntartó funkciójukat, így megnő az extracelluláris K^+ koncentráció, és tovább fokozódik a Glu mennyisége is (Wakita és mtsai., 1994; Rudolphi és Schubert, 1997).

A hatásos terápia megtervezésében nagyon fontos az ischaemiás eseményeket követő patomechanizmusok pontos időbeli behatárolása.



3. ábra A fokális ischaemiát követő patofiziológias eseménysor időbeli lefutásának vázlatja (Dirnagl és mtsai., 2003).

A fentebb részletezett folyamatok közül a glutamát excitotoxicitás, a Ca^{2+} intracelluláris felhalmozódása és az oxigén szabadgyökök keletkezése az ischaemiás periódus után percekben belül bekövetkezik. Az apoptózis és az ezzel egyidőben kialakuló gyulladásozó folyamatok megindulása órákkal később kezdődik meg, lefolyásuk pedig az ischaemia mértékétől függően napokig, de akár hetekig is eltarthat (Dirnagl és mtsai., 2003) (3. ábra).

A kórosan megemelkedett glutamát szint csökkentésének lehetősége

Az utóbbi időben nagy hangsúlyt fektettek az agyi glutamát transzporterek nagy családjának vizsgálatára, amelyek megtalálhatóak mind az axon terminálisokon, mind a periszinaptikus asztrocitákon (Danbolt, 2001). Ezek a Na^+ -függő excitatórikus aminosav transzporterek (EAAT-ek) képesek kötni, és felvenni a normális idegi működés során felszabaduló glutamátot (Gottlieb és mtsai., 2003). Egy serkentő glutamáterg szinapszis fiziológiás működése során a preszinaptikus axonterminálisokban található vezikulákból Glu-ot szabadít fel, amely a szinaptikus résekbe ürül, ezáltal a Glu koncentrációja hirtelen ezerszeresére nő (1 mM) a nyugalmi állapothoz képest. A felszabaduló Glu nagy része kötődik a poszt-szinaptikus membránon nagy számban jelen lévő Glu receptorokhoz, a feleslegben maradó molekulákat pedig felveszik a szinapszist kehely szerűen körbeölelő glia sejtek, amelyek membránján nagy számban találunk EAAT-et. Ez a szinaptikus elrendeződés megakadályozza a serkentés nagy mértékű térbeli kiterjedését (Rusakov és Kullmann, 1998; Savtchenko és Rusakov, 2004; Savtchenko és Rusakov, 2005). A Glu koncentrációja a fent leírt folyamatok révén pillanatok alatt visszaáll 1 μM -ra a szinapszisokban és az extracelluláris/interstitiális folyadékban (Beart és O'Shea, 2007) egyaránt. A Glu ezen koncentrációi, ilyen körülmények között nem citotoxikusak, és kórosan fokozott aktivitást (overexcitáció) sem okoznak (Danbolt, 2001).

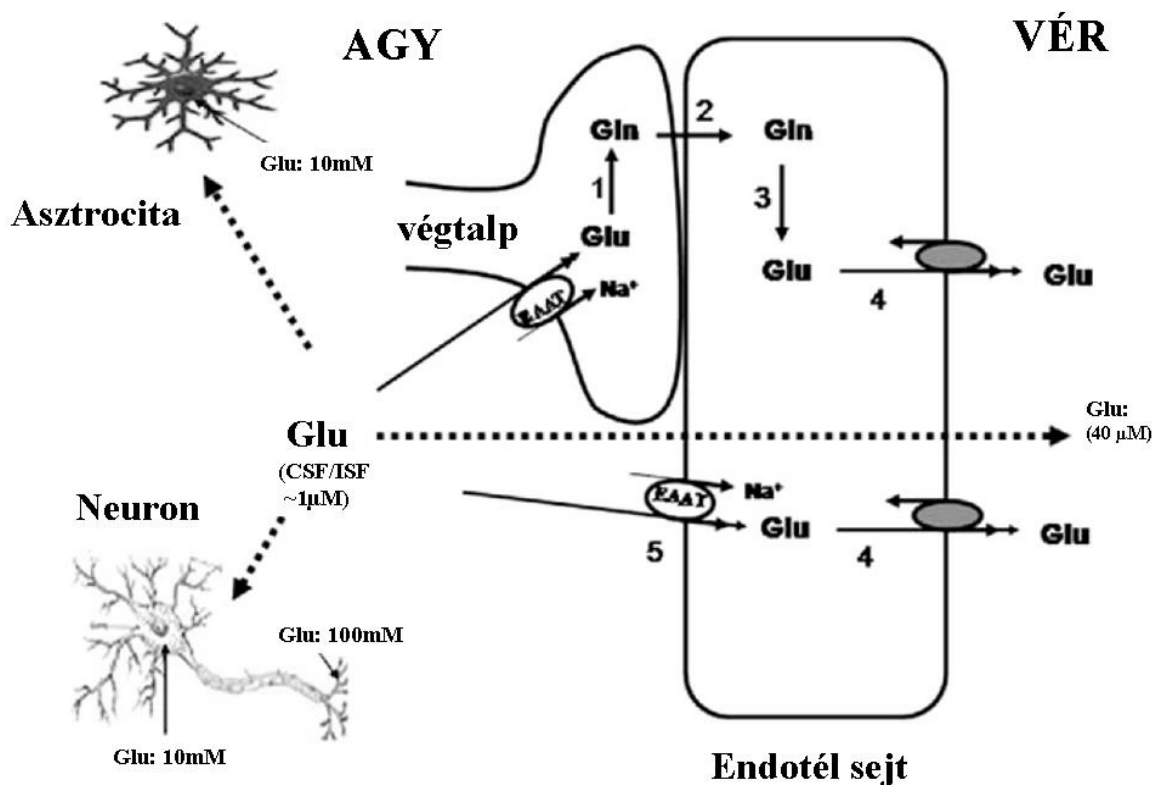
Az utóbbi években azonban bebizonyosodott, hogy vezikuláris Glu felszabadulás történik a glia sejtekből is, amely túlmutatva a szinapszisokon egy jóval kiterjedtebb serkentést valósíthat meg (Montana és mtsai., 2006; Vesce és mtsai., 2007). Az agyat ért patológiás események során kórosan megnövekedő Glu szintnek a háttérében az infarktus core és penumbra régiójára jellemző depolarizáció áll. A tartós depolarizáció következtében a gliákon található EAAT-k fordított módon kezdenek működni, és Glu-t adnak le (Montana és mtsai., 2006; Vesce és mtsai., 2007). Ez a „reverz” működés okozza az extrém magas Glu szintet, amely a kiterjedt károsodást és neuronpusztulást okozhatja.

Az agyi erek falában is megtalálható endotheliális sejteken elhelyezkedő glutamát transzporterekre (O'Kane és mtsai., 1999) és ezek szerepére az extracelluláris glutamát koncentráció szabályozásában ezidáig kevés figyelmet szenteltek. Az utóbbi években azonban kiderült az is, hogy az érendothél falában szintén nagy számban található EAAT-k működése nem változik meg a patológiás körülmények között (Vesce és mtsai., 2007). Két szorosan összefüggő kompartmentet különböztethetünk meg, amelyekben eltérő módon történik a Glu transzportja: a vasculáris endothéliumot, amely a vér-agy-gát (BBB) részét képezi, és a choroid epithéliumot, amely a vér-cerebrospinalis folyadék-gátat (BCB) formázza. Ez az utóbbi choroid plexus, amely aktív kiválasztással távolítja el a glutamátot a cerebrospinalis folyadékból a vérbe (Segal és mtsai., 1990). Az első esettel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy az agy érzettsége rendkívül kifejezett, az átlagos távolság két kapilláris között mindössze 10-20 mikron (Pawlik és mtsai., 1981; Bickel és mtsai., 2001). Mivel a glutamát a transzporterei révén képes átlépni a vér-agy-gáton, valószínűnek tűnt az, hogy az erek illetve a vér részt vehet a szinapszisok és az extracelluláris/intersticiális folyadék glutamát koncentrációjának szabályozásában. A feltételezés háttérében az állt, hogy nem csak a gazdag agyi érhálózat falában találunk nagy számban EAAT-eket, hanem az azokat körülölelő asztrocita végtalpakon is számos található belőlük (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995). Ezúton a kapillárisok falában található EAAT-k aktívan részt vehetnek az agy Glu „mentésében”, a még kevésbé ismert, de nagyon jelentős agyból a vérbe történő Glu-efflux révén. A folyamat minden olyan patológiás esetben fontos szerepet játszhat, ahol az agy intersticiális és cerebrospinalis folyadékában abnormálisan magas Glu koncentrációkat találunk. Ez pedig az összes ischaemiás állapotra, számos neurodegeneratív elváltozásra, traumás agyi sérülésekre, valamint bakteriális és egyéb eredetű fertőzésekre egyaránt jellemző (Castillo és mtsai., 1996; Zauner és mtsai., 1996; Johnston és mtsai., 2001).

Az utóbbi évtizedekben bebizonyosodott, hogy a vérből az agy felé is történhet Glu transzport, azonban ez a folyamat nagyon lassú (Oldendorf, 1971; Sershen és Lajtha, 1976) és korlátozott (al-Sarraf és mtsai., 1995; al-Sarraf és mtsai., 1997a; al-Sarraf és mtsai., 1997b; al-Sarraf és Philip, 2003). Ugyanakkor a Glu efflux az agyból a vér irányába a kapillárisok antiluminális oldalán található Na^+ függő EAAT-eken keresztül nagyon gyorsan megy végbe (O'Kane és mtsai., 1999). Az EAAT-k legalább öt altípussal rendelkeznek (Bridges és Esslinger, 2005; Bunch és mtsai., 2009), azonban a ligand szelektivitásra és lokalizációra vonatkozó részletes ismereteink jelenleg csak három altípusra terjednek ki. (EAAT1, EAAT2, EAAT3). Az érendotél sejtek abluminális oldalán mindhárom altípus közel azonos számban található meg (O'Kane és mtsai., 1999), azonban az asztrocita végtalpakon az EAAT1 és

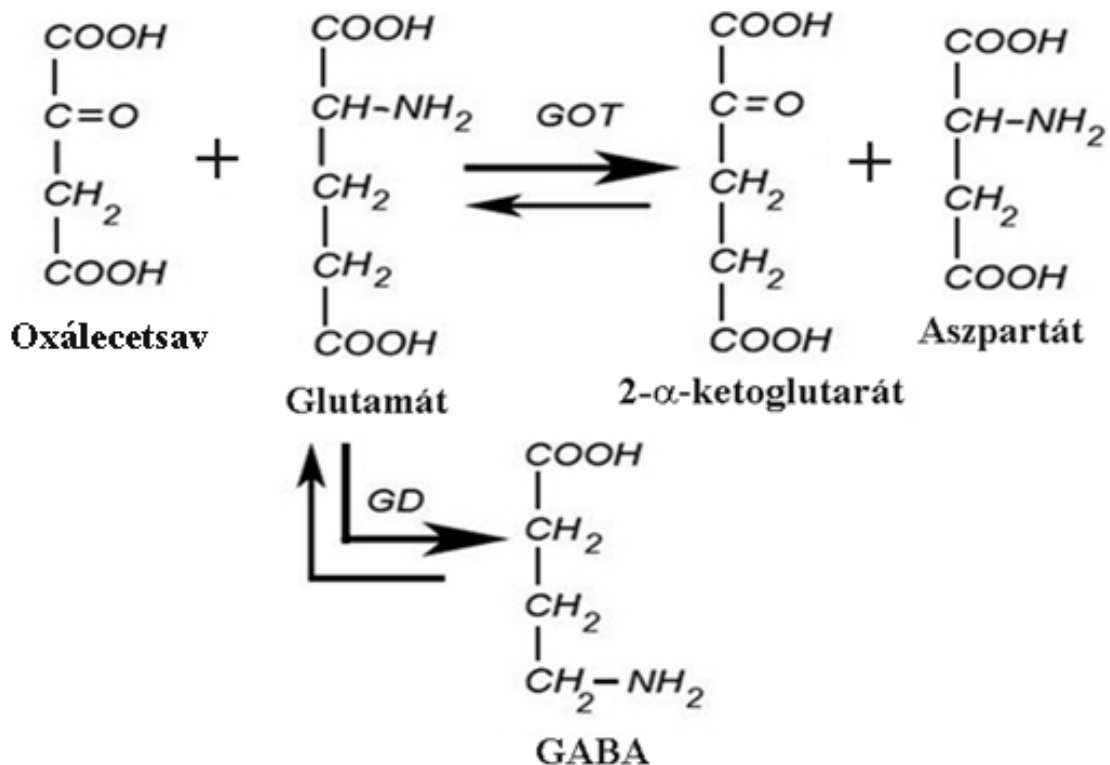
EAAT2-es altípus előfordulása gyakoribb az EAAT3-hoz képest (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995; Danbolt, 2001).

A Glu koncentrációja az agy interstitiális (ISF) és cerebrospinális folyadékában (CSF) 1-10 μM , amíg a vérben 40-60 μM . Az agyból a vérbe történő Glu efflux az extracelluláris tér és a vérplazma között fennálló kedvezőtlen koncentráció-gradiens ellenére is végbemegy az érendotél antiluminális oldalán található Na^+ -függő transzporterek működése révén. Amint az endotél sejtben lévő Glu koncentráció meghaladja a plazmában lévő Glu koncentrációt, megindul a Glu facilitatív transzportja a kapillárisok lumene felé (O'Kane és mtsai., 1999) (4. ábra).



4. ábra A Glu koncentrációk alakulása a központi idegrendszer (CNS) különböző kompartmentjeiben. Az asztrocita végtalpak felveszik a felhalmozódott Glu-ot az ISF-ből, ahol is a Glu átalakul glutaminná (Gln) a glutamin szintetáz által (1). A keletkezett Gln az endotél sejtek abluminális membránján lévő neutrális aminosav transzporterek révén átkerül az érendotél sejtekbe (2). Itt a Gln visszaalakul Glu-tá a glutamináz enzim működése révén (3), az így keletkezett Glu facilitatív transzport révén (4) átjut a vérbe. Az érendotél abluminális membránján is találunk EAAT-ek (5), amelyek speciális fiziológias és patofiziológias körülmények között képesek a Glu-ot közvetlenül bejuttatni az endotél sejtbe (Teichberg és mtsai., 2009).

Gottlieb és munkatársai (2003) ezen az alapon tesztelték azt a hipotézist, hogy az agy cerebrospinális/interstitiális folyadéka és a vérplazma között kialakított nagyobb Glu koncentráció grádiens esetén megnövekedik-e a szívóerő az agyból a vérbe történő glutamát effluxhoz. A vérplazma csökkent Glu szintjének eléréséhez a vérben található enzimeket használták fel. Ezek névszerint a glutamát-piruvát-transzamináz (GPT), és a glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT), amelyek a glutamát ko-szubsztrátjainak jelenlétében (piruvát és oxálacetát) a glutamátot 2- α -ketoglutaráttá és aszpartáttá alakítják. Ezen folyamatok biokémiai hátterét szemlélteti az oxálecetsav (OxAc) esetében az 5. ábra.

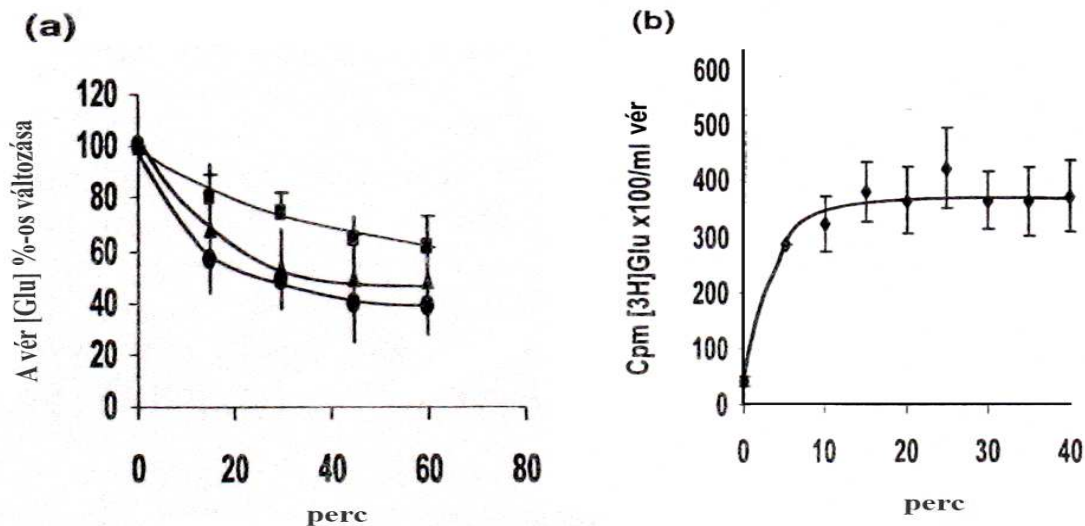


5. ábra A Glu átalakulás biokémiai háttere, amely magában rejti a kórosan megemelkedett Glu-szint csökkentésének lehetőségét is. Az oxálecetsavat és a glutamátot a glutamát-oxálacetát-transzamináz enzim 2- α -ketoglutaráttá és aszpartáttá alakítja. További lehetséges folyamat a GABA-vá történő átalakulás a glutamát dekarboxiláz enzim közvetítette dekarboxiláció révén.

GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz, GD: glutamát dekarboxiláz, GABA: γ -amino-vajsav

A bemutatott Glu átalakulás kétirányú folyamat. Ha azonban az OxAc-ot magas koncentrációban és feleslegben alkalmazzuk, akkor a folyamat eltolható a 2- α -ketoglutarát és aszpartát keletkezés irányába, ezzel csökkenthető a Glu szint. Kísérletes bizonyítékok vannak arra, hogy az intravénásan (i.v.) a keringésbe juttatott piruvát és/vagy OxAc lecsökkentette a vér Glu szintjét, és ezáltal megnövelte az agyból a vérbe történő Glu-efflux hatékonyságát és

sebességét (Gottlieb és mtsai., 2003). A vér Glu szintjének detektálását Gottlieb és munkatársai fluorometriás módszerrel végezték *in vitro*, az agyból a vérbe történő Glu efflux méréséhez pedig radioaktívan jelölt [^3H] Glu-t injektáltak a jobb oldali oldalsó agykamrába, és nyomon követték a vér aktivitásának változásait (6. ábra).



6. ábra Glutamát koncentrációk alakulása a vérben. (a) A vér glutamát koncentrációjának százalékban megadott változása az alapértékhez (100%) képest. A méréseket a $t=0$, 15, 30, 45, 60 percben végezték 1 mM-os piruvát (■), 1 mM-os oxálacetát (▲) és 1 mM-os piruvát és oxálacetát keverékének (●) beadása után. Minden pont négy független kísérlet ($n=4$) átlagát mutatja \pm SD. (b) A vér radioaktivitásának változása az agykamrába történő radioaktív [^3H] Glu injektálás után. Minden pont négy független kísérlet ($n=4$) átlagát mutatja \pm SD. (Gottlieb és mtsai., 2003)

Összefoglalva elmondható, hogy az agy kórosan megnövekedett Glu tartalmát közvetett módon mérsékelni lehet a vér Glu szintjének csökkentésével. Ezidáig az OxAc esetleges neuroprotektív hatásait nem tanulmányozták, de a piruvát pozitív hatásai állatkísérletes modelleken az előagyi ischaemiában és a vérvesztés során bekövetkező sokkos állapotban már bizonyítottak (Izumi és mtsai., 1994; Matsumoto és mtsai., 1994; Ruiz és mtsai., 1998; Maus és mtsai., 1999; Mongan és mtsai., 1999; Lee és mtsai., 2001). A kísérletek rámutattak, hogy az OxAc hatékonyabb lehet, mint a piruvát, mivel képes javítani a mitokondriális energiafelhasználást is a malát-aszpartát átalakulásának felgyorsításával. Továbbá ketosav révén képes semlegesíteni a traumás agysérülések után felszabaduló hidrogén-peroxidot (H_2O_2), amely az egyik legreaktívabb oxigén származék (Desagher és mtsai., 1997). A legfrissebb kutatások rámutattak arra, hogy az OxAc képes meggyorsítani a zárt feji sérülések utáni gyógyulást, és visszaszorítani az agyödéma kialakulását is (Zlotnik és mtsai., 2006).

Pre- kontra poszt kondicionálás

Az ischaemiás poszt kondicionálásról sokan azt gondolták, hogy egy vadonatúj koncepció, amely 5-6 évvel ezelőtt jelent meg a szívizomzatot érintő ischaemia kutatás során (Tsang és mtsai., 2005; Zhao, 2007). Mások azt hitték, hogy az ischaemiás prekondicionálás fogalmából (Vinten-Johansen és mtsai., 2005) vagy a részleges és szabályozott reperfúzióból származik (Tsang és mtsai., 2005). Az első tudósítás az ischaemiás poszt kondicionálásról több mint fél évszázada jelent meg (Sewell és mtsai., 1955), amely jóval megelőzi az ischaemiás prekondicionálás 1964-es (Dirnagl és mtsai., 2003) vagy a részleges és szabályozott reperfúzió 1960-as évek beli publikálását (Vinten-Johansen és mtsai., 2005). Ugyanakkor a poszt kondicionálást, mint szabályszerű elnevezést mindössze 14 évvel ezelőtt fogalmazták meg (Na és mtsai., 1996), amely így valóban jóval elmarad az időben a prekondicionálás fogalmától.

Már az 1950-es években megfigyelték azt, hogy ha a szívinfarktust követően azonnal helyre állítják az artériás keringést, akkor kamrai fibrilláció alakul ki, amely a keringés összeomlásához és halálhoz vezethet (Sewell és mtsai., 1955). Ez a felfedezés kapcsolatban áll a ma is használatos reperfúziós károsodás fogalmával. Sewell és munkatársai (1955) kutyaszíven végzett vizsgálataik során rájöttek arra, hogy az infarktust követően a koszorúerek szakaszos reperfúziója – amely megfeleltethető a mai ischaemiás poszt kondicionálásnak – megszünteti a kamrai fibrilláció kialakulását. Ezeket a kísérleteket ismételték meg 1996-ban macskákon Na és mtsai. Eredményeikből kiderül az, hogy a kamrai fibrilláció megelőzésében a poszt kondicionálás ugyanolyan hatékony lehet, mint a prekondicionálás. Azóta a szívizomzatot érintő ischaemia utáni poszt kondicionálás jótékony hatásait számos tanulmányban megerősítették (Zhao és Vinten-Johansen, 2006), beleértve a patkány (Obal és mtsai., 2005), egér (Kin és mtsai., 2005), (Krolikowski és mtsai., 2006) és sertés (Iliodromitis és mtsai., 2006) modelleken végzett kísérleteket, továbbá *in vitro* méréseket is (Dosenko és mtsai., 2006). A poszt kondicionálás sikerességéről érkező számos jelentés végül elvezetett a humán klinikai próbák fázisáig (Staat és mtsai., 2005).

A következő kérdés az lehet, hogy az ischaemiás poszt kondicionálás alkalmazható-e a szíven kívül az agyban is? A válasz valószínűleg abban rejlik, hogy a szívet és az agyat érintő ischaemia után beinduló patológias folyamatok és az ezek ellen irányuló terápiás kezelések mennyire hasonlíthatóak egymáshoz. Korábbi tanulmányok rámutattak arra, hogy a szívet és

az agyat érintő ischaemiás károsodás mechanizmusai nagyon sok szempontból hasonlítanak egymáshoz. A hasonlóságok közé tartozik az ischaemiás/reperfúziós károsodás (Kinouchi és mtsai., 1991), a kalpain-függő nekrotikus útvonal (Yamashima, 2000), a citokróm c/kaspáz közvetítette apoptotikus útvonal (Chen és mtsai., 1998; Zhao és mtsai., 2003), a MAPK útvonal (Noshita és mtsai., 2002), a protein kináz C (PKC) útvonal (Shimohata és mtsai., 2007a; Shimohata és mtsai., 2007b) és az Akt túlélő útvonal beindulása is (Zhao és mtsai., 2005). Továbbá bizonyított az, hogy az ischaemiás prekondicionálás jelentősen csökkentette az ischaemia után kialakuló sérülés mértékét a szíven és az agyban is (Murry és mtsai., 1986; Perez-Pinzon, 2004). A hasonlóságok és a korábbi eredmények fényében ésszerűnek tűnt az ischaemiás poszt kondicionálás vizsgálata az agyat érintő ischaemiás állapotokban is.

Kezdetben az ischaemiás prekondicionálás csak a rövid, időszakos szubletális inzultusokat jelentette, amely hatására a későbbi ischaemiás károsodás elleni védelem, ischaemiás tolerancia alakul ki (Murry és mtsai., 1986). Azóta kiderült, hogy számos megelőző szubletális patofiziológiás stresszor szolgálhat triggerként az ischaemiás tolerancia kialakulásához. Kiváltó stresszor lehet többek között rövid idejű, mérsékelt globális vagy fokális ischaemia, enyhe gyulladás, epilepsziás görcstevékenység, a metabolizmus gátlása, hipo- vagy hipertermia, az oxigén szabad gyökök fokozott képződése, terjedő kérgi depolarizáció (cortical spreading depression, CSD), valamint oxidatív stressz is (Dirnagl és mtsai., 2003). Az utóbbi években kiderült az, hogy néhány altatószer is alkalmas az ellenállóképesség javítására ischaemiás állapotban (Kitano és mtsai., 2007; Wei és mtsai., 2007). A prekondicionáláshoz hasonlóan a poszt kondicionálás is előidézhető nemcsak egy vagy több rövid, szubletális ischaemiás vagy hipoxiás periódussal (Pignataro és mtsai., 2008) vagy megszakított, szakaszos reperfúzióval (Zhao és mtsai., 2006), hanem több, neurotoxikus anyag is alkalmazható (Burda és mtsai., 2006), mint második patofiziológiás stresszor. Ilyen anyagok közé tartozik a 3-nitropropionsav, a noradrenalin, a bradikinin (Burda és mtsai., 2006; Danielisova és mtsai., 2007) és a Glu analóg kainsav (KA) is. A választott anyagtól és stratégiától függően változhat az, hogy a szubakut patofiziológiás stresszort mikor alkalmazzuk az ischaemiás inzultus vagy a reperfúzió kezdetéhez viszonyítva. Ha a beavatkozás a reperfúzió megindulása után közvetlenül, vagy 30 percen belül történik akkor korai, ha ennél később (akár 2 nappal is), akkor késői poszt kondicionálásról beszélünk (Ren és mtsai., 2008). Prekondicionálás esetében pedig a toleranciát kiváltó inzultus megelőzi az ischaemiás periódust.

Az ischaemiás prekondicionálás ígéretes klinikai stratégia lehetne, ha az ischaemiás inzultus előre megjósolható lenne, de ez legfeljebb csak valószínűsíthető. Azonban szív- és

agyműtétek előtt, valamint a stroke kockázatnak fokozottan kitett betegek esetében elméletileg ischaemiás prekonkondicionálással fel lehet készíteni, ellenállóbbá lehet tenni az agyat (Nagy és mtsai., 2005). A tolerancia kialakítását azonban jelentősen megnehezíti az, hogy a védőmechanizmusokat már indukáló, de még nem károsító, valamint a már sejt- és szövetkárosodást eredményező hypoxia/ischaemia sem időtartamában, sem súlyosságában nem áll távol egymástól. Ez pillanatnyilag lehetetlenné teszi a toleranciaindukció klinikai alkalmazását (Nagy és mtsai., 2005).

Mindezek fényében széleskörű vizsgálatok indultak a posztkondicionálás esetleges neuroprotektív hatásainak tanulmányozására az agyat érintő ischaemiás modelleken. Hamar kiderült az, hogy a posztkondicionálás számos esetben figyelemreméltó védőhatást fejtett ki (Zhao, 2009). A korai és késői ischaemiás posztkondicionálás is hatásosnak bizonyult, és csökkentette az infarktus kiterjedését a fokális ischaemiás modelleken, különböző megszakított reperfúziós ciklusokat alkalmazva (Zhao és mtsai., 2006; Zhao, 2007; Gao és mtsai., 2008b; Pignataro és mtsai., 2008; Ren és mtsai., 2008). Megvizsgálták azt is, hogy a védőhatás mennyi ideig marad fenn, hiszen más neuroprotektív eljárásoknál, mint például a posztischaemiás hipotermia (Dietrich és mtsai., 1993) vagy a rövid ischaemiás prekonkondicionálás (Perez-Pinzon, 2004) kiderült, hogy a kialakult tolerancia csak néhány napig tart. Ugyanakkor a lényegesen kisebb kiterjedésű szöveti károsodás sem feltétlenül jelenti azt, hogy az érintett agyterület funkciója is megóvásra került (Dumas és Sapolsky, 2001). Hosszú távú tanulmányokban különböző magatartási vizsgálatokból kiderült, hogy az ischaemiás periódust követő korai ischaemiás posztkondicionálás után 1 hónappal (Gao és mtsai., 2008a), késői posztkondicionálás után pedig akár 2 hónappal (Ren és mtsai., 2008) később is megmaradtak az érintett agyterület neurológiai funkciói. A fokális ischaemia utáni védelmet nemcsak ischaemiás útvonalon (megszakított reperfúziós ciklusok), hanem egy elterjedt altatószer, az izoflurán alkalmazásával is sikerült kiváltani (Lee és mtsai., 2008). Néhány kutatócsoport a globális ischaemia utáni posztkondicionálás lehetőségeit vizsgálta meg. Wang és munkatársai (2008) patkányokon végeztek idegsejt-károsodásra és magatartási vizsgálatokra kiterjedő méréseket. A korai ischaemiás posztkondicionálás 1 héttel a reperfúzió után is jelentős védőhatást mutatott, hasonlóan az egereknél tapasztalt neurológiai deficit-csökkenést mutató eredményekhez (Rehni és Singh, 2007). Hasonlóan a fokálishoz, a globális ischaemia utáni védőhatást is sikerült nemcsak ischaemiás posztkondicionálással (Burda és mtsai., 2006), hanem különböző neurotoxikus farmakonokkal is kiváltani (Burda és mtsai., 2006; Danielisova és mtsai., 2006). Ezek név szerint: 3-nitropropionsav, noradrenalin és bradikinin. Fontos kiemelni továbbá azt, hogy a 3-nitropropionsav és a noradrenalin akár 2

nappal az ischaemiás inzulturn után alkalmazva is hatásosnak bizonyult (Burda és mtsai., 2006), amely a klinikai alkalmazhatóság szempontjából egy igen fontos faktor, hiszen sajnos nagyon ritka az, hogy az ischaemiát elszenvedő páciens diagnosztizálása és a megfelelő kezelés kellően rövid időn belül bekövetkezzen.

In vitro tanulmányokból kiderült, hogy az oxigén és tápanyag megvonása (OGD) szintén jelentős neuroprotektív hatással bír ischaemiás eseményeket követően agykérgi sejt kultúrákban (Pignataro és mtsai., 2008) és hippocampális agysejteken (Scartabelli és mtsai., 2008) egyaránt. Az előzőekhez hasonlóan a védőhatást *in vitro* körülmények között szintén nemcsak ischaemiás úton, hanem egy metabotróp Glu receptor agonista vegyülettel, a 3,5-dihidroxi-fenil-glicinnel (Scartabelli és mtsai., 2008) és a korábban már említett izofluránnal (Lee és mtsai., 2008) is sikerült kiváltani.

A számos protektív hatást alátámasztó tanulmány ellenére a poszt kondicionálás sejt szintű és molekuláris háttérmechanizmusai javarészt még ismeretlenek. A prekondicionálással ellentétben az ischaemiás poszt kondicionálás elkülönítése önmagában a hosszan tartó ischaemiás inzulturn után beinduló patológiás mechanizmusoktól jóformán lehetetlen, hiszen hatásaik összemosódnak. Hasonlóan nehéz a helyzet a neurotoxikus anyagok alkalmazásánál, hiszen könnyen elképzelhető, hogy egy vegyület némileg eltérő hatásokat vált ki egy ischaemiás károsodást szenvedett, és egy intakt, egészséges agyban. Ezért a protekciót biztosító különböző poszt kondicionálást használó stratégiák sejt szintű és molekuláris háttérmechanizmusainak feltérképezése külön kihívást jelent a kutatók számára. Mindezek ellenére számos tanulmány számbavétele alapján kissé részletesebb képet kaphatunk a poszt kondicionálás jótékony hatásairól. Több kutatócsoport is bizonyította azt, hogy fokális ischaemiát követően az ischaemiás poszt kondicionálás javította a penumbra régió vérellátását (Zhao és mtsai., 2006; Gao és mtsai., 2008a), amelyet a teljes agyi vérellátásra vonatkozóan globális ischaemiát követően is leírtak (Wang és mtsai., 2008). Az azonnali és teljes reperfüzió fokozza az oxigén szabad gyökök felszabadulását, amely apoptózishoz vezet (Chan, 1996), továbbá a kialakuló gyulladási reakciók szintén súlyosbítják az ischaemiás károsodás mértékét (Bowen és mtsai., 2006). Az ischaemiás poszt kondicionálásról bebizonyosodott az, hogy csökkenti a szuperoxidok mennyiségét (Zhao és mtsai., 2006) és a lipid peroxidáz enzim szintjét is (Xing és mtsai., 2008). Danielisova és munkatársai (2006) pedig kimutatták azt, hogy 2 nappal a globális ischaemiás állapot kialakítása után korai poszt kondicionálást alkalmazva az antioxidáns enzimek, név szerint a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) aktivitása jelentősen megemelkedik az agyban. A gyulladási folyamatok során leukociták lépnek ki az érpályából az agyszövetbe, és

aktivitásuk során károsítják a lipidmembránokat, a fehérjéket és a DNS-t (Chan, 1996). A gyulladás a citokinek, úgy mint az IL-1 β és a TNF α , valamint az adhéziós molekulák, mint például az ICAM-1 által közvetített folyamat (Kriz, 2006). A korai poszt kondicionálás 24 órával a stroke után csökkenti az agykéregben a mieloperoxidáz aktivitását, amely enzim megjelenése a leukociták akkumulálódását jelzi (Xing és mtsai., 2008). Xing és munkatársai (2008) azt is leírták, hogy a korai poszt kondicionálás csökkenti az IL-1 β és a TNF α mRNS expresszióját, valamint az ICAM-1 fehérje kifejeződését az agykéregben. Mindezen túl, Wang és munkatársai által 2008-ban végzett vizsgálatokból kiderül, hogy a korai poszt kondicionálás csökkenti a citokróm-c felszabadulását a mitokondriumból a citoszólba, amely egy kritikus lépés az apoptózis folyamatának beindításában. Összességében elmondható tehát, hogy a poszt kondicionálás gyulladás csökkentő hatással bír, valamint képes gátolni a programozott sejthalál folyamatainak indukcióját, ezáltal mérsékelni tudja az ischaemiás károsodás mértékét.

A molekuláris folyamatok vizsgálatával foglalkozó laboratóriumok eredményei alapján valószínűsíthető az, hogy a poszt kondicionálás védő hatásának kialakításában részt vesz az Akt túlélő útvonal (Gao és mtsai., 2008b; Pignataro és mtsai., 2008), a MAPK túlélő útvonal (Sawe és mtsai., 2008), a protein kináz-C izoenzimek szintjének megváltozása (Gao és mtsai., 2008b), valamint az ATP függő K⁺ csatornák nyitása is (Lee és mtsai., 2008). A fent említett molekuláris háttérmechanizmusok részletekbe merülő tárgyalása azonban túlmutat ezen diszsertáció keretein.

A kainát receptorok szerepe az idegrendszerben

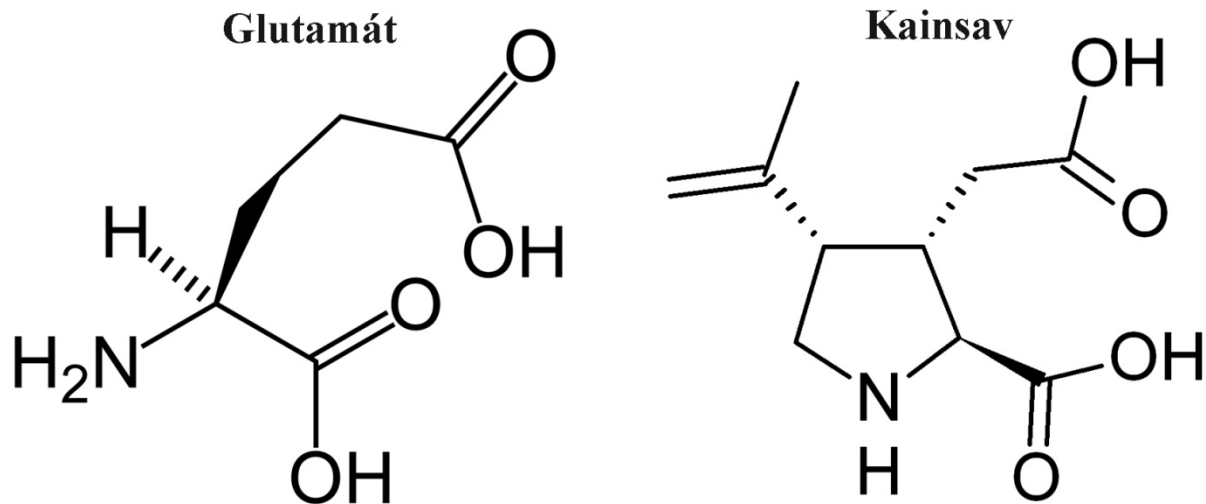
Az ionotróp Glu receptorok családjába tartozó kainát receptorok (KAR-ok), az idegrendszer számos területén fontos szerepet játszanak a glutamáterg jeltovábbításban és a szinaptikus plaszticitásban egyaránt (Bleakman és Lodge, 1998; Bortolotto és mtsai., 1999; Chittajallu és mtsai., 1999; Frerking és Nicoll, 2000; Kullmann, 2001; Huettner, 2003; Lerma, 2003; Isaac és mtsai., 2004; Jaskolski és mtsai., 2005). Amíg a pre- és poszt szinaptikusan elhelyezkedő KAR-ok specifikus módon képesek szabályozni a szinaptikus transzmisszió folyamatait, addig az extraszinaptikus receptorok az excitabilitás szabályozásában vesznek részt (Huettner, 2003; Lerma, 2003). A KAR-ok növelik a neuronális folyamatok változékonyságát, mivel G-fehérje kapcsolt szignalizációs receptorként is képesek viselkedni (Rozas és mtsai., 2003; Lauri és mtsai., 2005). Ezen túl egyre inkább bizonyítottnak tűnik az is, hogy a KAR-ok

szerepet játszanak a szinapszisok kialakításában és fejlődésében egyaránt (Tashiro és mtsai., 2003; Marchal és Mulle, 2004; Lauri és mtsai., 2005; Lauri és mtsai., 2006). Különösen igaz ez a hippocampális moha rostok szinapszisaira, ahol a KAR-ok képesek irányítani az axonális filopodiumok mozgását (Tashiro és mtsai., 2003), amely folyamat az újonnan formálódó szinapszisok kezdeti stádiumában figyelhető meg. A KAR-ok farmakológiai aktivizálása a hippocampus CA1-es régiójában erősen csökkenti a glutamáterg szinaptikus jeltovábbítást (Chittajallu és mtsai., 1996; Vignes és mtsai., 1998; Clarke és Collingridge, 2002). Ez a hatás a preszinaptikus oldalon található receptoroknak tudható be, amelyek a felszabaduló Glu mennyiségét szabályozzák G-fehérjéhez kötött folyamatok révén (Frerking és mtsai., 2001; Lauri és mtsai., 2006). Ezek a preszinaptikus KAR-ok megtalálhatók és farmakológiai úton aktiválhatók a fiatal felnőtt patkányokban is, azonban érdekes módon a fiziológias aktivitásukat csak az újszülöttkori fejlődésben írták le (Lauri és mtsai., 2006). Az újszülöttkori patkányok CA1-es régiójában a szóban forgó preszinaptikus receptorok tónusosan aktivált állapotban vannak a jelenlévő Glu-nak köszönhetően, ezáltal csökkentik a Glu felszabadulás lehetőségét az éretlen szinapszisokban (Lauri és mtsai., 2006). Ez a tónusos aktivitás a fejlődés során leszabályozódik, amely alátámasztja a KAR-ok szerepét a glutamáterg szinapszisok érési folyamataiban (Vesikansa és mtsai., 2007).

A Glu receptor alegységek klónozásos vizsgálatai alapján kiderült, hogy az azonosított alegységek két különböző ionotróp (vagy nem NMDA típusú) receptor fajtát építhetnek fel, név szerint az AMPA és a KAR-okat (Hollmann és Heinemann, 1994; Bettler és Mulle, 1995). Összesen 4 AMPA típusú (GluR1, GluR2, GluR3 és GluR4) és 5 KAR típusú (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 és KA2) alegységet azonosítottak, amelyek tetramer kombinációban épülnek fel, az AMPA és KAR alegységek kereszt kombinációjának lehetősége nélkül (Bettler és Mulle, 1995). Vesikansa és munkatársai (2007) leírták, hogy a GluR5 alegységet tartalmazó KAR-ok kísérletes aktiválása jelentősen megnövelte, amíg ugyanezen receptorok hosszú távú gátlása pedig jelentősen lecsökkentette a piramissejtek működő glutamáterg szinapszisainak számát a hippocampus CA1-es régiójában. Ezek az adatok alátámasztják a KAR-ok fontos szerepét a glutamáterg szinapszisok kialakulásában és stabilitásában.

A Glu szerkezeti analógja a kainsav (KA), amelyet először egy vörös alga fajból a *Digenea simplex*-ből vontak ki (Nitta és mtsai., 1958; Shinozaki és Konishi, 1970). A KA ionotróp Glu receptor agonista lévén, egy hatásos serkentő neurotoxin, amely magas dózisban alkalmazva excitotoxicitást (Olney és mtsai., 1974) és jelentős sejtpusztulást is okozhat (Nadler és mtsai., 1978; Sperk és mtsai., 1983) az arra érzékeny agyterületeken. Ezen túl a

KA az egyik legelterjedtebb farmakon az állatkísérletes temporális epilepszia kialakításában is (Nadler, 1981; Ben-Ari, 1985).



7. ábra A glutamát és analógjának, a kainsavnak a szerkezeti felépítése

A kainsavra és receptoraira vonatkozó ismereteink fényében munkacsoportunkban megvizsgáltuk azt, hogy a KA alkalmas lehet-e patkányokban a farmakológiai posztkonkondicionálás jótékony hatásainak kiváltásához globális hipoperfúziót követően.

A fokális ischaemia modell és az alkalmazott vizsgálati módszerek rövid bemutatása

Az átmeneti vagy tartós fokális ischaemiás állapot előidézéséhez a leggyakrabban alkalmazott módszerek a középső agyi artéria irreverzibilis vagy reverzibilis elzárása (middle cerebral artery occlusion, MCAO (Brint és mtsai., 1988; Duverger és MacKenzie, 1988; Barone és mtsai., 1992; Buchan és mtsai., 1992; Xue és mtsai., 1992; Barone és mtsai., 1997) és a fototrombotikus lézió, amelyet először Watson és munkatársai írtak le 1985-ben (Watson és mtsai., 1985). Az első módszer legfőbb hátránya, hogy invazív, egyik féle kialakításához a koponyacsont eltávolítása szükséges, amelynek nem elhanyagolható hatásait később már nem lehet kiküszöbölni. Előnye azonban, hogy átmeneti fokális ischaemiás állapot kialakítására is alkalmas. Munkacsoportunkban a másik elterjedt modellt alkalmaztunk a fokális ischaemia kialakításához, amelyet a könnyű alkalmazhatósága és jó reprodukálhatósága miatt számos szervben és szervrendszerben alkalmaznak az agyon kívül is (Kleinschnitz és mtsai., 2008).

Számos közlemény született a gerincvelőben (Madsen és mtsai., 1998), az artéria carotisban (Shariat-Madar és mtsai., 2006), a bélben (Yano és mtsai., 1997) vagy a belső fülben (Asai és mtsai., 1993) kialakított fototrombotikus léziót alkalmazó modellekről. A modell további előnye, hogy nem invazív, a fokális ischaemiás állapot előidézése akár az intakt koponyacsonton keresztül is megtörténhet. A trombózis kialakításához egy fényérzékeny anyagot, legtöbbször Bengal Rose-t juttatunk a kísérleti állat vérkeringésébe, majd egy meghatározott helyen erős fényvel megvilágítjuk a véredényeket tartalmazó intakt szövetet. A megvilágítás a keringésben lévő anyag lokális aktiválódásához és szabad gyökök képződéséhez vezet, ami az endothélium peroxidációját okozza (Dietrich és mtsai., 1987a; Dietrich és mtsai., 1987b). A folyamat végül a trombociták aktiválódása révén aggregátumok (trombusok) kialakulásához és a vér-agy gát sérüléséhez vezet (Rosenblum és El-Sabban, 1977; Lee és mtsai., 2007). A fototrombotikus lézió ezen túl ismétlődő kérgi kúszó-depressziós (cortical spreading depression) epizódokat okozhat, amelyet az extracelluláris Glu szint jelentős növekedése kísér (Scheller és mtsai., 2000).

Az akut, fokális ischaemiás inzultus hisztológiailag kimutatható sejtpusztulást, az elektrofiziológia szintjén pedig a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válaszok (SEPs) csökkenését (Lye és mtsai., 1987), kérgi diszinhibíciót (Farkas és mtsai., 2003) valamint az infarktus területén regisztrálható depolarizációt okoz (Mies és mtsai., 1993). Munkacsoportunkban a fototrombózissal előidézett fokális ischaemia szomatoszenzoros kérget érintő funkcionális hatásait a kiváltott válaszok (KV) segítségével tanulmányoztuk.

A SEPs kiváltásához a patkányoknál a leggyakrabban a bajusszőrök (vibrisszák) mechanikai vagy elektromos ingerlését alkalmazzák (Simons, 1983; Lur és mtsai., 2006). A vibrisszák follikulusait a nervus trigeminus maxilláris leágazása, az infraorbitális ideg innerválja (Arvidsson, 1982; Rice és mtsai., 1986). A follikulusokban Merkel-testek és szabad idegvégződéses találhatók (Rice, 1993; Rice és mtsai., 1993). Az ingerléssel kiváltott ingerület a pszeudounipoláris érzékszövet perifériás nyúlványain keresztül eljut a Gasser dúcnak nevezett trigeminális ganglionba, ahol a szenzoros neuronok sejtestjei találhatók. A ganglionban a bajuszpárnákban található follikulusok durva szomatotópiája figyelhető meg. Az információ innen a primer érzékszövet centrális nyúlványán keresztül az agytörzsi trigeminális rendszer különböző magvaiba jut (Belford és Killackey, 1980). Ezek név szerint: nucleus principalis (nPr), subnucleus interpolaris (snI), subnucleus oralis (snO) és a subnucleus caudalis (snC) (Greuel és mtsai., 1988; Chiaia és mtsai., 1992). Az itt található barreletteknek nevezett strukurális alegységekből az információ a thalamusz ventrális postero-mediális (VPM) magjába és a posterior nucleusba (Po) jut (Chiaia és mtsai., 1991a;

Chiaia és mtsai., 1991b). A thalamuszban a bajuszpárnák follikulusait reprezentáló elemeket barreloidoknak nevezzük (Van Der Loos, 1976). A thalamokortikális (TC) axonok a patkányok esetében a legnagyobb sűrűségben az agykéreg IV., barrel-kéregnek nevezett rétegében végződnek (Herkenham, 1980; Jensen és Killackey, 1987), és gyors monoszintikus excitációt biztosítanak (Armstrong-James és mtsai., 1992). A barrel-kéregnek visszacsatoló (feed-back) projekciói vannak a VPM-be (Welker és mtsai., 1988), valamint a trigeminális subnucleusokba is (Jacquin és mtsai., 1990). Az első elektrofiziológia vizsgálatok a barrel-neuronok, a vibrissák és barreljeik között funkcionális 1-1 vetületet mutattak (Welker, 1971), későbbi munkák során azonban kiderült, hogy az alkalmazott altató típusa és az altatás mélysége növelheti a divergenciát (Armstrong-James és Fox, 1987).

A Fluoro-Jade B (FJB) egy anionos fluoreszcen származék, amely a degenerálódó neuronokat festi meg (Schmued és Hopkins, 2000a; Schmued és Hopkins, 2000b). A neuronális károsodás számos kísérleti modelljében leírták a Fluoro-Jade és a FJB festések magas szelektivitását a degenerálódó neuronokra nézve (Schmued és Hopkins, 2000a; Schmued és Hopkins, 2000b; Obernier és mtsai., 2002). A FJB a Fluoro-Jade festék továbbfejlesztett analógja, amely az elődjéhez viszonyítva nagyobb affinitással kötődik a sérült neuronokhoz, így azokról jobb felbontású, részletgazdagabb és kontrasztosabb képet ad (Schmued és Hopkins, 2000a). Annak ellenére, hogy a Fluoro-Jade festékek molekuláris szerkezete és felépítése részleteiben ismert (Xue és mtsai., 1992; Schmued és mtsai., 2005), nagyon keveset tudunk arról, hogy melyik a degenerálódó neuronban megjelenő endogén molekulához kötődik valójában.

Az agykérget érintő akut, fokális ischaemiás állapotok nem csak a funkcionális károsodást jelző SEPs csökkenésében mutatkoznak meg (Lye és mtsai., 1987), a neuronok komoly károsodását Fluoro-Jade festéssel is jelezni lehet az érintett agyterületen (Villa és mtsai., 2007).

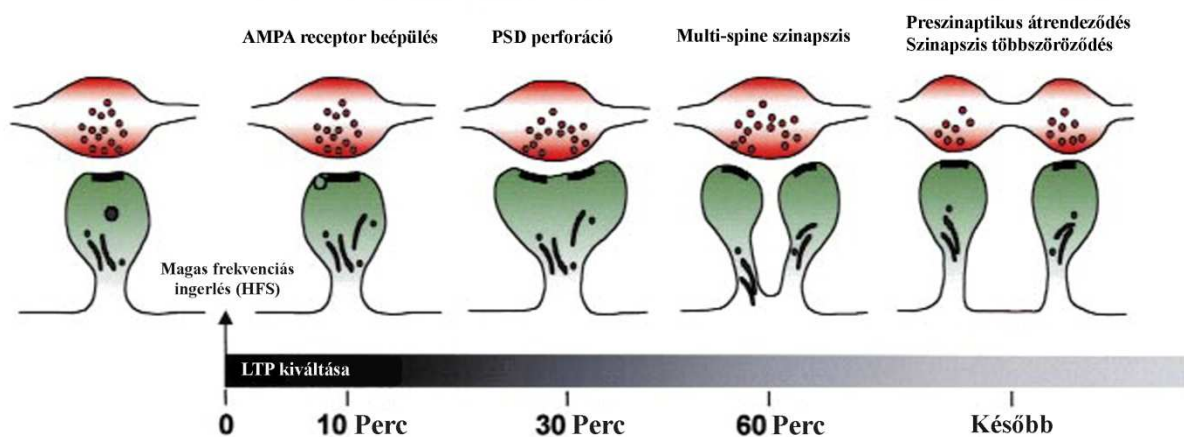
A globális hipoperfúziós modell és az alkalmazott vizsgálati módszerek rövid bemutatása

Az állatkísérletekben alkalmazott hipoperfúziós/ischaemiás modellek közül a leggyakoribb módszer az agyat ellátó valamelyik nagy artéria, és/vagy artériák irreverzibilis vagy reverzibilis elzárása. Az agyi vérellátás csökkenésének mértéke határozza meg azt, hogy hogyan változik a szinaptikus plaszticitás hatékonysága és hogy károsodnak-e az érintett

agyterülethez tartozó neurológiai funkciók. A legáltalánosabb módszer a teljes, globális agyi ischaemia kialakításához az un. 4 ér-elzárás módszere (4-vessel-occlusion, 4VO), amelyben az agy vérellátása meghatározott időre teljesen megszűnik. Ezt az állapotot a 2 arteria vertebralis elektrokauterrel történő irreverzibilis elroncsolásával és a 2 arteria carotis communis meghatározott időre történő reverzibilis leszorításával idézik elő (Burda és mtsai., 2006; Sas és mtsai., 2008). Mivel a kéreg mellett a hippocampus CA1-es régiója a legérzékenyebb agyterület az oxigén és tápanyag hiányos állapotokra (Pulsinelli és mtsai., 1983), ezért ezen agyterületen már néhány perces 4VO-t követően is kiterjedt, 70-80%-os sejtpusztulás detektálható (Burda és mtsai., 2006; Sas és mtsai., 2008). A teljes agyat érintő, de nem teljes ischaemiás állapotot globális hipoperfúciónak nevezzük. Ezen állapot kialakításához csak a 2 arteria carotis communist szorítjuk le (2-vessel-occlusion, 2VO) hosszabb-rövidebb időre. A 2VO paradigmát akut vagy krónikus agyi hipoperfúzió (atherosclerosis, arterio-venosus malformatio) és egyéb csökkent vérállatással járó betegségek pl. Alzheimer-kór (De Jong és mtsai., 1999; Farkas és Luiten, 2001) modellezésére is használják. A carotis-ok leszorítása után az agy vérellátása azonnal az egyharmadára csökken (Farkas és mtsai., 2007), azonban a patkányok Willis-köre teljes (Farkas és mtsai., 2007) ezért a vérellátás redisztribúciójára és a csökkent vérellátás kompenzációjára van lehetőség. Ennek köszönhetően az érzékeny elektrofiziológiai mérések alapján elmondható, hogy a 2VO csak kis mértékben okoz zavarokat a szinaptikus plaszticitás folyamataiban (Li és mtsai., 2006; Marosi és mtsai., 2009). Az idegsejt károsodásra és pusztulásra irányuló kevésbé érzékeny morfológiai vizsgálatokkal (FJB, S-100 és Nissl festés) pedig ezidáig egyáltalán nem sikerült jelentős különbséget kimutatni az intakt állapothoz képest (Marosi és mtsai., 2009).

A hosszútávú szinaptikus aktivitás növekedése, azaz az LTP (long-term potentiation), amelyet először Bliss és Lomo írt le (1973) altatott nyúl hippocampusában, a mai napig a legelfogadottabb módszer a memória és a tanulás sejtszintű mechanizmusainak vizsgálatához (Bliss és Collingridge, 1993; Martin és mtsai., 2000). Az LTP kiváltásához rövid ideig tartó nagy frekvenciás sorozatingerlést (HFS) vagy theta-burst ingerlést (TBS) (Rose és Dunwiddie, 1986; Shors és Matzel, 1997) alkalmaznak. A nagy frekvenciás ingerlés időbeli hossza és frekvenciája jelenti azokat a paramétereket, amelyek megszabják a plaszticitás mértékét és időbeli lefutását. Az LTP típusát tekintve lehet asszociatív és nem-asszociatív jellegű. Az asszociatív forma NMDA receptor-függő, heteroszinaptikus, azaz pre- és posztszinaptikus változások is történnek a két szinapszis társítása során. Ilyen típusú LTP indukálható a hippocampus CA3-as régiójából kiinduló Schaffer-kollaterálisok és a CA1-es régió piramis sejtjei között meglévő szinapszisokban (Bliss és Collingridge, 1993). A nem-

asszociatív forma NMDA-független, a preszinaptikus transzmitter felszabadulás fokozódása idézi elő, amelyet egy adott inger folyamatos ismétlése vált ki (Kandel és Schwartz, 1982). Nem-asszociatív típusú LTP indukálható a hippocampus gyrus dentatus szemcsesejtjei és a CA3-as piramis sejtek szinapszisaiban. Az LTP időbeli lefutását tekintve beszélhetünk a korai vagy átmeneti fázisról, amelyben a tetanikus ingerlés hatására felszabaduló Glu a poszt-szinaptikus sejt glutamáterg ioncsatornához kötődve Ca^{2+} beáramlást eredményez az intracelluláris térbe. A megnövekedett Ca^{2+} koncentráció, és az ezáltal elinduló enzimatis reakciók hatására retrográd messengerek szabadulnak fel a poszt-szinaptikus sejtéből, amelyek a preszinaptikus sejt transzmitter leadását fokozzák (Kandel és Schwartz, 1982), majd a folyamat végén többek között megnő az AMPA receptorok száma a poszt-szinaptikus membránban. A késői, vagy tartós fázisban fokozódik az új szinapszisok létrehozásához szükséges gének kifejeződése és a fehérjeszintézis is (Kandel és Schwartz, 1982; Bliss és Collingridge, 1993). A folyamat során a szinaptikus felület megnő, majd a perforációnak nevezett folyamat végén a dendrit elágazik és új szinapszist hoz létre (Geinisman és mtsai., 1991; Harris és mtsai., 2003)(8. ábra).



8. ábra Új szinapszisok keletkezésének sematikus ábrázolása a magas frekvenciás ingerléssel (HFS) kiváltott hosszú távú aktivitás fokozódás (LTP) során. Már 10 perccel a magas frekvenciás ingerlést követően a megnövekedett Ca^{2+} koncentráció hatására új AMPA receptorok szállítódnak vezikulákba csomagolva a poszt-szinaptikus membránba. Mindez a poszt-szinaptikus denzitás (PSD) megnövekedését is eredményezi. 30 perc elteltével megtörténik a PSD perforációja, majd egy eddig ismeretlen mechanizmus révén létrejön a többszörös (multi-spine) szinapszis. Retrográd szignalizáció révén, vélhetően adhéziós molekulák közvetítésével, valamivel több, mint egy óra elteltével megtörténik a szinapszisok teljes szétválása (Luscher és mtsai., 2000).

Az utóbbi évtizedben számos tudományos közleményben megjelent kísérleti eredmény támasztja alá azt az elképzelést, miszerint az LTP és a memória kialakulásának hátterében a

hippocampusban található piramis sejtek dendrittüskéinek és a tüskeszinapszisainak az átrendeződése, számuk növekedése és ezek stabilizálódása áll (Sorra és Harris, 2000; Kandel, 2001; Kasai és mtsai., 2003). A dendrittüskék adják a legfőbb szinaptikus bemeneti helyeket, így kulcsszerepet játszanak az agyat felépítő sejtek kapcsolatainak kialakításában (Fiala és mtsai., 2002)(9. ábra). A dendrittüskék plaszticitására vonatkozó ismereteink segíthetik a normális fejlődés, valamint a tanulás és memória folyamataiban bekövetkező szinaptikus változások megértését is. Az utóbbi években a dendrittüskék vizsgálata kulcsfontosságú szerepet kapott a patológiás folyamatokban, hiszen ezek a fénymikroszkóppal is vizsgálható struktúrák, kiváló indikátorai a szinaptikus kapcsolatok változásainak (Globus és Liversage, 1975; Ryugo és mtsai., 1975). A szinaptogenezis során egy dinamikus, ujj-szerű struktúra, a filopodium türemkedik ki a dendritek falából és a környezetükben található axonokkal vagy axonális filopodiumokkal lépnek kontaktusba (Fiala és mtsai., 1998). Amennyiben a filopodium kapcsolatot talál, akkor visszahúzódik és közben magával vonja a környezetében található axont is. A visszafejlődött filopodium helyén pedig megjelenik az érett dendrittüske és megtörténik a szinaptogenezis folyamata (Fiala és mtsai., 1998).



9. ábra Hippocampus CA1-es régióban található piramisisejt stratum radiatum rétegéből származó dendritikus szegmensének a rekonstrukciója. A serkentő szinapszisok (vörös) a dendrittüskék megvastagodott fején, a gátló szinapszisok (kék) pedig a dendritek törzsén találhatóak. Skála: 1µm (Fiala és mtsai., 2002).

A dendrittüskék szerepe nemcsak a szinapszisok kialakításában kulcsfontosságú, hiszen az excitotoxicitás során megemelkedett Ca^{2+} -szintet is képesek pufferelni (Yuste és Denk, 1995; Majewska és mtsai., 2000). A hosszabb dendrittüskék a hálózat szintjén, elektromosan és biokémiaiilag lokálisan izolálhatják az excitotoxikus hatásokat. Ez segítheti a neuront a

posztischaemiás agyban lévő káros folyamatok kivédésében, mint pl. a megemelkedett Ca^{2+} -szint (Calabresi és mtsai., 2003) és a kúszó depresszió (Back és mtsai., 1994). A dendrittüskék sokrétű feladatainak fényében látható, hogy a patológiás elváltozásaik jelentős hatással bírhatnak az agyi funkciókra.

Mivel az agy rendkívül érzékeny az oxigén és tápanyag hiányos állapotokra, már 20 perces ischaemia is jelentősen károsítja a dendrittüskéket, varikozitások alakulnak ki, amely később számuk csökkenéséhez vezet (Park és mtsai., 1996). Ilyen ischaemiás/hipoxiás állapotot követő dendrittüskeszám-csökkenést leírtak újszülött bányában (Rees és mtsai., 1999), patkányok hippocampusában (Pokorny és mtsai., 1982), a nucleus caudatusban (Norton és Culver, 1977) és a szenzo-motoros kéregben egyaránt (Akulinin és mtsai., 1997). Ez a morfológiai változás ráadásul igen gyors lehet, sebessége összemérhető az LTP kialakulásának sebességével (Fischer és mtsai., 1998; MacLusky és mtsai., 2005). Már viszonylag rövid ideig tartó hipoperfúzióról is bebizonyították, hogy csökkenti az LTP indukálhatóságot; 20 perces kétoldali carotis leszorítás után már nem sikerült tartós LTP-t kiváltani (Li és mtsai., 2006). *In vitro* kísérletekben már ennél is rövidebb hypoxia (3-6 perc) elég volt az LTP indukálhatóságának jelentős lerontásához (Gasparova és mtsai., 2008). Krónikus hipoperfúzió kapcsán a kísérleti állatok tanulási képességének csökkenését (Kudo és mtsai., 1990; de la Torre és mtsai., 1992; Ohta és mtsai., 1997) és a motoros teljesítmény romlását (Sekhon és mtsai., 1997) többen megfigyelték.

Amennyiben egy ischaemiás hatás következtében zavar alakul ki a szinaptikus működésekben, azt az LTP kiválthatóságának csökkenésével és az alapvető glutamáterg szinaptikus transzmisszió romlásával párhuzamosan a dendrittüskék számának csökkenése is jelzi. Munkacsoportunkban megvizsgáltuk a 30 percig tartó globális hipoperfúzió káros hatásait, amelyet aztán megpróbáltuk kainsavval történő poszt kondicionálással kivédeni.

Célkitűzések

1. Munkacsoportunkban célul tűztük ki a fototrombotikus lézióval előidézett fokális agyi ischaemia káros hatásainak elektrofiziológia tanulmányozását az érintett terület core és penumbra régiójában egyaránt. Az *in vivo* elektrofiziológiai mérések eredményeinek kiegészítéséhez és megerősítéséhez szövettani vizsgálatokat is terveztünk.
2. Az utóbbi években több közlemény is megerősítette az oxálecetsav neuroprotektív hatásait zárt feji sérülés (Zlotnik és mtsai., 2008) és globális hipoperfúzió (Marosi és mtsai., 2009) esetében is. Kísérleteinkben az oxálecetsav utókezelés esetleges neuroprotektív hatásának vizsgálatát tűztük ki célul a fent említett fokális ischaemia modellben.
3. A globális agyi hipoperfúzió funkcionális következményei viszonylag jól ismertek (Li és mtsai., 2006), azonban szövettani elváltozásokat nem sikerült kimutatni még a hipoxiára leginkább érzékeny hippocampális CA1-es régióban sem 30 percig tartó 2VO esetében (Marosi és mtsai., 2009). A második nagy kísérletsorozatunkban az *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálatok mellett törekedtünk egy megfelelően érzékeny morfológiai módszer optimalizására, amely tükrözi a globális hipoperfúzió szinaptikus következményeit.
4. A poszt kondicionálás egy viszonylag új és kevésbé ismert neuroprotektív stratégia. Munkacsoportunkban célként tűztük ki a kainsavval különböző időpontokban történő poszt kondicionálás esetleges neuroprotektív hatásának vizsgálatát a fent említett globális agyi hipoperfúziós modellben.

Anyagok és módszerek

Felhasznált állatok:

Vizsgálataink során felnőtt hím Wistar (N=110) patkányokat használtunk fel. Az állatok 220-300 g súlyúak voltak. Az állatház hőmérsékletét folyamatosan 23 °C fokon tartottuk illetve 12:12 órás sötét-világos periódust biztosítottunk. Az állatokat minden esetben külön, szabványos műanyag ketrecekben tartottuk állandó szabad hozzáférést biztosítva az élelemhez és a vízhez. Hogy elkerüljük az állatok szenvedését, az invazív beavatkozásokat mély altatott állapotban végeztük illetve törekedtünk a felhasznált állatok számának minimalizálására. Kísérleteink során minden esetben betartottuk a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai Közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendeletét (86/609/EEC).

Fokális ischaemia modell:

Az agykérget érintő akut, fokális ischaemia rövid távú káros következményeinek és az OxAc utókezelés esetleges neuroprotektív hatásának a vizsgálatához funkcionális (*in vivo* elektrofiziológiai) és hisztológiai kísérleteket végeztünk.

Kísérleti állatcsoportok a fokális ischaemia modellben:

A kísérleteinkhez felhasznált kísérleti állatcsoportokat az 1. táblázat mutatja be az állatok számával és a mortalitási adatokkal együtt. A kísérletekhez annyi állatot használtunk fel, hogy minden csoportban minimum 5 darab túlélő állat kerüljön értékelésre.

N/Mortalitás	Elektrofiziológia	Szövettan	Összesen
Álműtött kontroll csoport	5/0	Ø	5/0
Fototrombotikus léziós (FL) csoport (kezeletlen csoport)	7/2	12/4	19/6
FL + Oxálecetsavval (OxAc) kezelt csoport (kezelt csoport)	6/1	6/1	12/2
Összesen	18/3	18/5	36/8

1. táblázat: A fokális ischaemia modellben alkalmazott állatcsoportok az elektrofiziológiai és a szövettani kísérletekhez felhasznált állatok számával (N) és a mortalitási adatokkal. Amíg az álműtött kontroll csoportban nem volt, a fototrombotikus lézió után átesett (FL) csoportban hozzávetőlegesen 31,5%-os, a FL után oxálecetsav (OxAc) kezelésben részesült csoportban pedig megközelítőleg 16,6%-os mortalitást tapasztaltunk.

Fototrombotikus lézió:

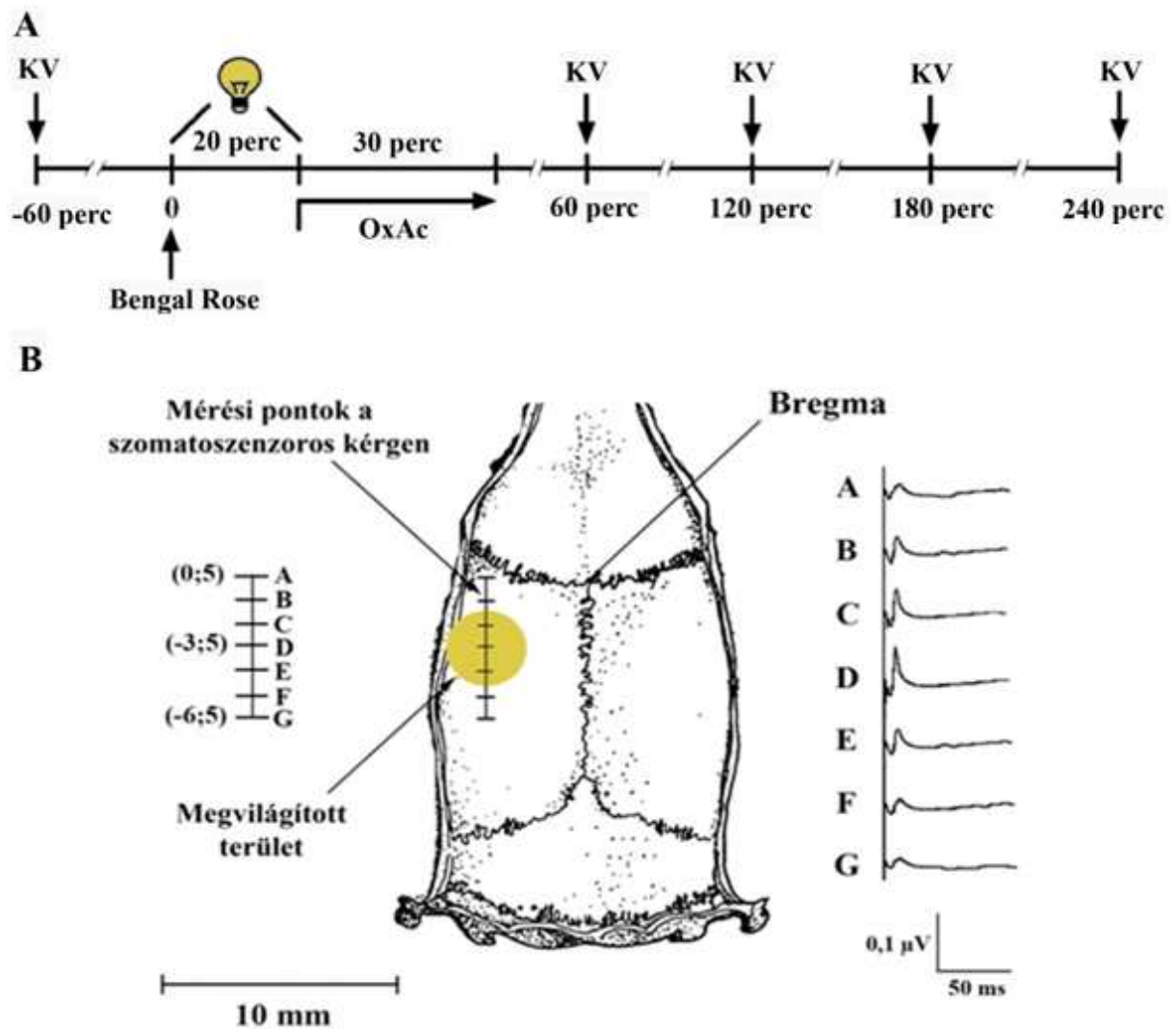
Az agykérget érintő akut fokális ischaemiás állapotot fototrombotikus lézióval váltottuk ki. A sebészeti beavatkozások során intraperitoneális (i.p.) uretán (Sigma-Aldrich, München, Németország) injekcióval (1,3 g/ ttkg) altattuk az állatokat, amely egyenletes, hosszan tartó mély alvást biztosított, ezáltal alkalmas volt a több órán át tartó mérésekhez. Az állatok testhőmérsékletét egy rektális hőmérővel összekötött feed-back szabályozással ellátott infravörös lámpa segítségével folyamatosan $37 \pm 0,5$ °C –on tartottuk. Miután pupillareflex vizsgálattal megbizonyosodtunk az altatás sikerességéről, kiperaráltuk, és steril injekciós tűt (Luer 23G) helyeztünk az állatok baloldali farokvénájába a későbbi i.v. anyagbeadás megkönnyítéséhez. Ahhoz hogy elkerüljük a vér tübe alvadását, kis mennyiségű heparint (Biochemie, Ausztria) juttattunk a vénába, majd a tű végét légmentesen záró dugóval zártuk le. A patkányok fejét sztereotaxiás készülékben (David Kopf Instrument, Tujunga, USA) rögzítettük, majd baloldalon az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (SSI) feletti területről eltávolítottuk az állatok fejbőrét és az egyéb kötőszövetes elemeket. A koponyacsontot fiziológiás sóoldattal letisztítottuk, hogy a tájékozódást megkönnyítő mérőpontok, mint például a Bregma (a sutura sagittalis és a sutura coronalis találkozási pontja), jól láthatóvá váljanak. A fototrombotikus lézió kiváltásához Bengal Rose (Sigma-Aldrich) oldatot (30 mg/ ttkg)

juttattunk 1 ml térfogatban az állatok keringésébe i.v. az előzőleg elhelyezett kanülön keresztül. Az anyagbeadást lassan végeztük, hogy egyenletes eloszlást biztosítsunk az állatok keringésében. Az oldat beadását követően 20 percen keresztül világítottuk meg az állatok SSI kérgét az intakt koponyacsonton keresztül, 3 mm átmérőjű diafragma nyílás mellett, erős, hideg fényel (Fibrolux 150H; 10. ábra B). A fokális ischaemia kialakítása után az állatok 4 óras túlélést követően kerültek előkészítésre a szövettani vizsgálatokhoz (10. ábra A).

In vivo elektrofiziológia:

A fokális ischaemia a központi idegrendszer működésére gyakorolt káros hatásait a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válaszok mérésével vizsgáltuk. Ehhez a patkányok trigeminális rendszerét ingereltük a jobb oldali bajuszpárnába szúrt bipoláris tüelektródák segítségével. Az ingerlés 0.3 ms jeltartamú, 4-6 V amplitúdójú és 0.1 Hz-es frekvenciájú négyszögimpulzusokkal történt (WPI 301-T, Sarasota, Florida, USA). A perifériás ingerlés hatására keletkező ingerület az infraorbitális idegen keresztül áthalad a nucleus Principalis-on (Pr5), majd a thalamuszon (VPM) átkereszteződve éri el a szomatoszenzoros kérget. Az ingerlést úgy állítottuk be, hogy a tüelektródákon keresztül érkező impulzusok a bajuszpárna még éppen látható mozgását váltsák ki. A rágcsálók bajusszőrei (vibrisszák) öt sorban helyezkednek el, amelyeket a szentől kezdődően nagybetűkkel (A-E) jelölnek. Az egy sorban helyet foglaló vibrisszák számozása pedig a fültől kezdődően számokkal történik. Az ingerlő elektródákat minden esetben a C2-es és C5-ös bajuszszőr folliculusába szúrtuk. Az ingerlés megkezdése után a gömbfejű, ezüst elvezető elektródát az elsődleges szomatoszenzoros kérgi terület fölé helyeztük, és megkerestük azt a helyet, ahol az adott ingerre a sejtek a legnagyobb amplitúdóval válaszolnak (punctum maximum, 10. ábra D pont). Ez a pont az általunk használt C2-C5-ös folliculus ingerlés esetében a Bregmától caudálisan 3, laterálisan 5 mm-re található egy 250 g-os állat esetében. A punctum maximumtól rostrálisan és caudálisan is további 3-3 ponton végeztünk méréseket, így összesen 7 különböző mérőpontunk volt, amelyek egy virtuális vonal mentén helyezkedtek el 5 mm-re a középvonaltól (10. ábra B). A mérőpontok az elsődleges szomatoszenzoros kéreg területén kívül a mellső végtagi régiót és részben a parietális asszociációs kérgi területet is magában foglalják (Paxinos és Watson, 1998). Mivel az elvezetések az intakt koponya felszínéről végeztük, ezért elektróda-pasztát alkalmaztunk, hogy biztosítsuk a megfelelő elektromos kontaktust. A regisztrátumokat differenciál erősítő segítségével amplifikáltuk, (Tektronix AM502, Beaverton, USA), és a

külső forrásokból származó zajokat az erősítőn található sávszűrő segítségével küszöböltük ki. A szűrési tartomány alsó határa 1 Hz, a felső határa pedig 3 kHz volt. A biológiai jeleinket analóg-digitális konverter (Digidata 1200, Axon Instruments, USA) segítségével digitalizáltuk. Az adatokat számítógépen tároltuk a további feldolgozáshoz (pClamp 6.0.4. software, Axon Instruments, USA). A kiváltott válaszokat (6/perc) 3 percen keresztül regisztráltuk minden mérőpontban, majd ezeket átlagoltuk (18 KV minden pontban). A regisztrálás megkezdése előtt körülbelül egy órával megkezdtük az ingerlést, hogy a kiváltott válaszok amplitúdója stabilizálódjon a kezdeti jellemző oszcilláció után. A regisztrálás minden állatsoportban egy kontroll szakasz felvételével kezdődött a fototrombotikus lézió kiváltását megelőzően, amely minden egyes mérőpontot magában foglalt. A fokális ischaemia kiváltását követően a méréssorozatok 1, 2, 3 és 4 órával az inzultus után kezdődtek (10. ábra A).

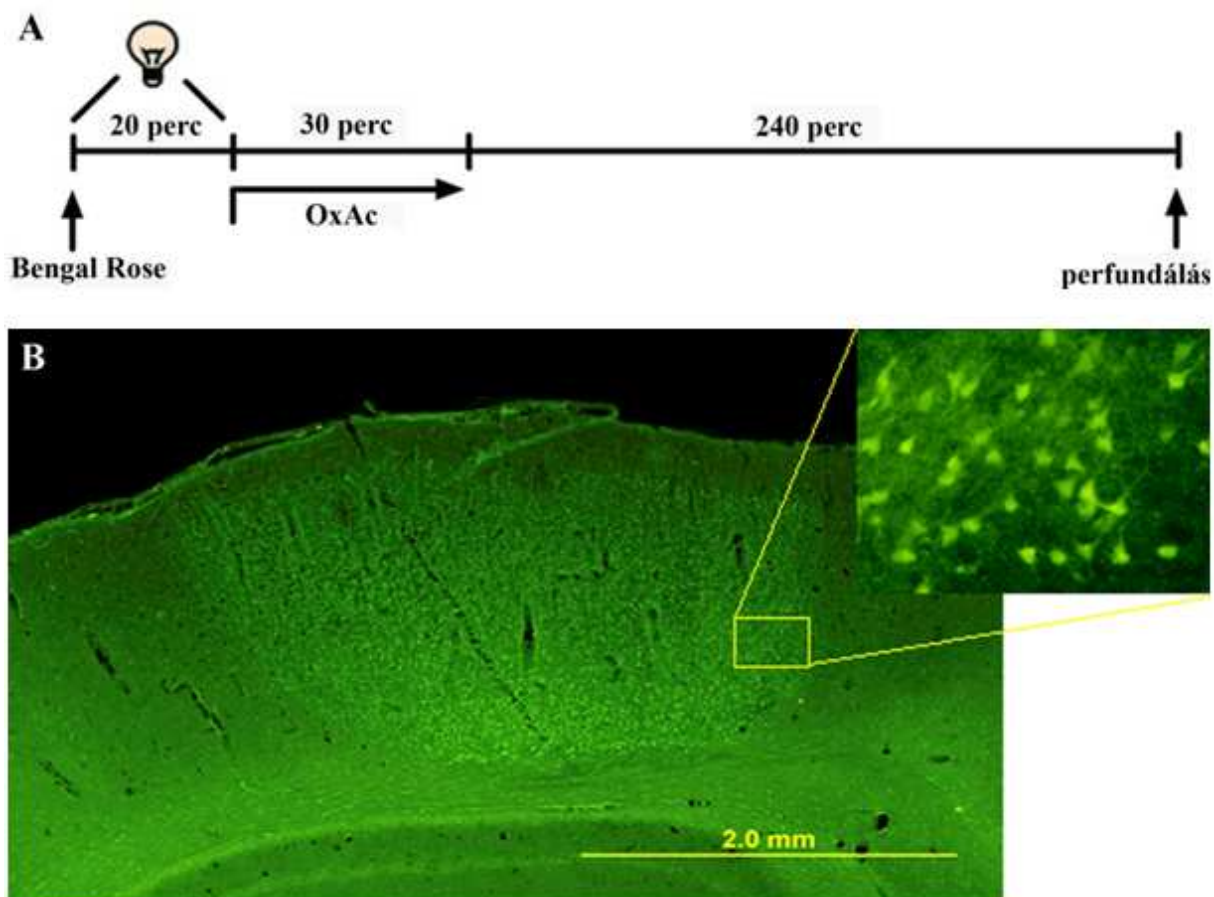


10. ábra A fototrombotikus lézió kiváltását és az alkalmazott elektrofiziológia mérések protokollját bemutató sematikus illusztrációk. **A:** A kiváltott válaszok (KV) vizsgálatára irányuló funkcionális kísérletek protokollja. A fokális ischaemia kiváltását minden esetben egy kontroll regisztrátum felvétele előzte meg (-60 perc). A Bengal Rose beadást (30 mg/ttkg, i.v.) egy 20 percig tartó erős, hideg fényvel történő megvilágítás követte. A megvilágítás a punctum maximum pontban (D) történt az elsődleges szomatoszenzoros kéreg feletti területen, egy 3 mm átmérőjű rekesznyíláson keresztül. A kezelt csoportba tartozó állatok ezt követően egy 30 percig tartó OxAc kezelést (12 mg/ttkg; i.v.), a kezeletlen csoport tagjai fiziológiás sóoldatot kaptak. Az anyagbeadást követő 240 perces periódusban óránként mértük a kiváltott válaszok amplitúdójának változásait a **B** panelen bemutatott koordinátákon. **B:** A kiváltott potenciálok regisztrálását 7 különböző koordinátán végeztük egy virtuális vonal mentén a középvonaltól 5 mm-re laterális irányban. Az amplitúdók punctum maximuma (D), a bregmától caudálisan 3, laterálisan 5 mm-re helyezkedett el. Rostrális (C, B, A) és caudális (E, F, G) irányban távolodva a punctum maximumtól a kiváltott válaszok regisztrált amplitúdói fokozatosan csökkentek.

Szövetten, Fluoro-Jade B festés:

A fokális ischaemia modellben a funkcionális vizsgálatok mellett szövettani vizsgálatokat is végeztünk. A fototrombotikus lézió következtében elhalt neuronok számának és a keletkezett lézió kiterjedésének meghatározása céljából egy specifikus fluorokróm festéket, a Fluoro-Jade B-t (FJB) használtuk. A szövettani vizsgálatok számára előkészített állatokat transzkardiálisan perfundáltuk foszfát pufferben (0,1 M) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal. Az agyakat óvatosan eltávolítottuk a koponyából az átmosás után, majd egy éjszakán át ugyanebben az oldatban utófixáltuk. Másnap az agyakat 24 órára 20%-os szacharóz oldatba helyeztük. Ezt követően fagyasztva metsző mikrotómmal (Frigomobil Modell 1206, Reichert-Jung, Nußloch, Németország) 36 µm vastag szeleteket metszettünk a teljes szomatoszenzoros kérgi lézió területéről. Az agyszeleteket PBS – 0,4%-os TritonX oldatok keverékéből zselatinózott tárgylemezre húztuk fel, ügyelve a szeletek pontos sorrendjére. A metszeteinket dehidratáltuk felszálló etanol sorban, majd 15 percre 0,06%-os kálium-permanganát oldatba helyeztük. Ezt követően a szeleteket desztillált vízben mostuk, mielőtt 30 percre 0,001%-os FJ-B (Chemicon) oldatba helyeztük. A festés után a metszeteket újból átmostuk desztillált vízben (3x1 perc), és egy napig száradni hagytuk a sötétkamrában. A megszáradt metszeteket a festés után Fluoromount segítségével fedőlemezzel lefedtük.

A sorozatmetszeteket mikroszkóp alatt (Olympus BX51, Tokió, Japán) vizsgáltuk. A gerjesztő fény hullámhosszát 470-490 nm-re állítottuk, a kibocsátott fény hullámhossza 520 nm volt. A jelölődött sejteket minden metszeten a számunkra kifejlesztett speciális program segítségével számoltuk össze. A kapott adatokat átszámoltuk 1 mm² területegységre illetve a metszetvastagság ismeretében kikalkuláltuk a lézió kiterjedését mm³-ben.



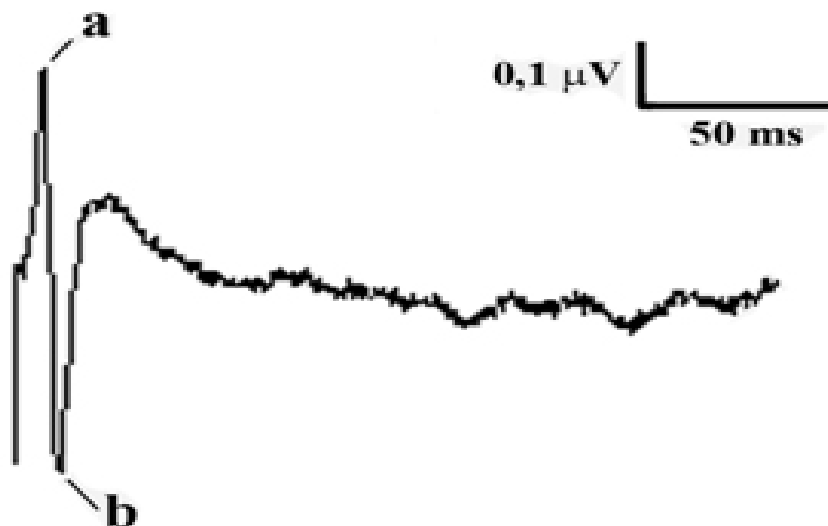
11. ábra A fototrombotikus lézió kiváltásának sematikus protokollja a szövettani vizsgálatok esetében (A). Fluoro-JadeB festés a szomatoszenzoros kérgen kialakított fokális ischaemia után (B; 60x-os nagyítás). A fototrombotikus lézió hatására az agykéregben elhalt vagy sérült neuronok jól láthatóan világítanak. Inszert: a lézionált terület egy részlete 240x-es nagyításban.

Oxálecetsav kezelés:

A kísérletek során az elektrofiziológiai és hisztológiai mérésekre kerülő kezelt csoportba tartozó állatok is 12 mg/ttkg mennyiségű és 1,5 ml végtérfogatú OxAc (Sigma-Aldrich, München, Németország) injekciót kaptak. Az i.v. anyagbeadás közvetlenül a 20 perces megvilágítás után (utókezelés) történt. Az alkalmazott dózist a korábban megjelent, glutamát scavengerek hatását vizsgáló szakirodalmi adatok alapján választottuk meg (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007; Teichberg és mtsai., 2008). Az OxAc egy erős sav ezért 0,2 M-os foszfát pufferben oldottuk fel, hogy a pH-ja 7,2-7,4 között legyen. Az anyagbeadást nagyon lassan végeztük (50 μ l/perc) 30 percen keresztül fecskendő és stopper segítségével, hogy elkerüljük a vértérfogat és ezáltal a vérnyomás hirtelen megemelkedését, illetve egyenletes eloszlást biztosítsunk a vérben. A kontroll csoportba tartozó állatok a kezeltekkel megegyező térfogatú fiziológiás sóoldatot kaptak.

Alkalmazott statisztikai módszerek:

A szomatoszenzoros kéreg területéről elvezetett kiváltott válaszok regisztrált amplitúdó értékeit a SPEL advanced Intrasy (v1.3.0.48; Experimetria Ltd.) szoftver segítségével csúcstól csúcsig, azaz a minimum és a maximum pontjuk között mértük meg (12. ábra). Azért, hogy összehasonlíthatóak legyenek a különböző állatokból származó adatok, a kontroll szakasz átlag értékéhez, mint 100%-hoz normalizáltuk az amplitúdó értékeket. A változóink eloszlásának vizsgálatához, minden esetben a Kolgomorov-Smirnoff tesztet, a variancia homogenitás vizsgálatához pedig a Levene-tesztet végeztük el. A különböző állatcsoportokban a *punctum maximum*ból elvezetett amplitúdó értékek időbeli különbségeinek statisztikai analíziséhez a parametrikus, egy-utas ANOVA tesztet végeztünk Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. Az egy állatcsoporton belül különböző koordinátákon, különböző időpontokban mért értékek statisztikai analíziséhez a páros-minta *t*-tesztet alkalmaztuk. A FJB pozitív sejtek számára és a lézió kiterjedésére vonatkozó statisztikai analízist a két független-minta *t*-teszttel végeztük. A statisztikai számításokat az SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) program segítségével végeztük el. Minden esetben a $P \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.



12. ábra Egy Szomatoszenzoros kérgi kiváltott választ mutató reprezentatív regisztrátum. A potenciál változások amplitúdóit a minimum (b) és maximum (a) csúcsok között mértük meg. A biológiai jelek maximum és minimum csúcsai az ingerbetörést követően 7-9 ms illetve 11-13 ms késéssel jelentkeztek.

Globális hipoperfúziós modell:

A teljes agyat érintő csökkent perfúzió rövid távú káros következményeit és a kainsav (KA) kezeléssel történő poszt kondicionálás, mint esetleges neuroprotektív beavatkozás lehetőségeit funkcionális (*in vitro* elektrofiziológia) és morfológiai (Golgi-Cox festés) mérőeszközökkel vizsgáltuk.

Kísérleti állatcsoportok a globális hipoperfúziós modellben:

A vizsgálatainkban felhasznált kísérleti csoportokat az állatok számával és a mortalitási adatokkal a 2. táblázat mutatja be. A globális hipoperfúziót elszenvedő (2VO) állatcsoportok kainsavval történő poszt kondicionálását az ischaemiás eseményt követően különböző időpontokban kíséreltük meg: 2VO után közvetlenül (2VO 0h KA), 1 nappal később (2VO 24h KA) és 2 nappal később történő KA kezeléssel (2VO 48h KA). Ezekben a csoportokban, valamint az álműtött kontroll csoportban az elektrofiziológiai és morfológiai méréseket 3 napos túlélést követően végeztük el. Az ischaemiás inzultust követően esetleg spontán (KA kezelés nélkül) bekövetkező funkcionális javulás vagy romlás vizsgálatához, a 2VO-t követően különböző túlélési idővel végeztünk elektrofiziológiai méréseket: 2VO után 1 nappal (2VO 24h), 2 nappal (2VO 48h), 3 nappal (2VO 72h) és 4 nappal (2 VO 96h). Az önmagában (2 VO nélkül) történő KA kezelés rövid távú hatásainak vizsgálatához szintén különböző túlélési időt követően végeztünk funkcionális vizsgálatokat: KA kezelést követően 1 nappal (KA 24h), 2 nappal (KA 48h) és 3 nappal (KA 72h).

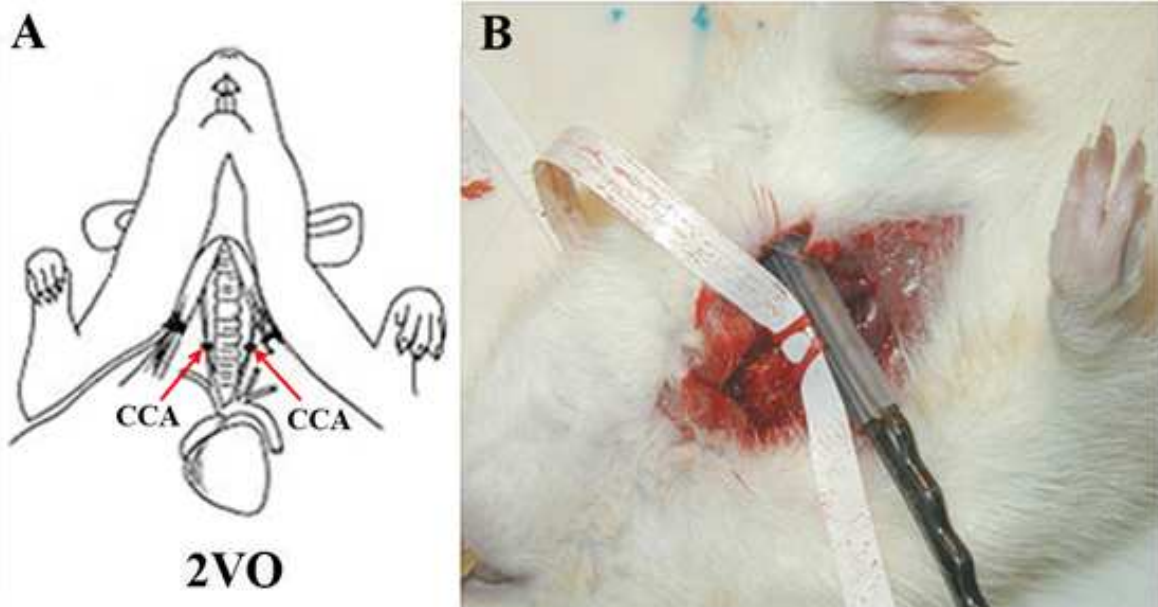
Az elektrofiziológiai mérésekhez annyi állatot használtunk fel, hogy minden csoportban az LTP indukció vizsgálatához minimum 8 darab, az I/O görbe felvételhez min 6 darab mérési adatsorunk legyen. Ez minimum 4 darab túlélő állatot jelent csoportonként. A szövettani méréseinkhez minden csoportban 3-3 állatot használtunk fel, hogy elérjük a kellően reprezentatív detektált dendrittüske számot (10 ezres nagyságrend).

N/csoport	Elektrofiziológia		Golgi-Cox
	állatszám / mortalitás	LTP indukció / IO görbe	állatszám/ vizsgált sejtszám/ detektált spine szám
Álműtött kontroll	4/0	8/6	3/60/32774
2VO 72h	6/2	8/6	3/60/15036
2VO 48h KA	4/0	8/6	3/60/30954
2VO 0h KA	8/4	8/0	Ø
2VO 24h KA	6/2	8/0	Ø
2VO 24h	6/2	8/0	Ø
2VO 48h	5/1	8/0	Ø
2VO 96h	6/2	8/0	Ø
KA 24h	4/0	8/0	Ø
KA 48h	4/0	8/0	Ø
KA 72h	4/0	8/0	Ø
összesen:	70/14	96/18	9/180/78764

2. táblázat A globális hipoperfúziós modellben felhasznált kísérletes állatcsoportok. Az elektrofiziológiai méréseinkhez összesen 62 db állatot használtunk fel, ebből 14 db pusztult el még a tervezett kísérletek előtt (~22%-os mortalitás). A szövettani méréseinkhez csoportonként 3 db állatot, állatonként 20 db CA1-es neuron apikális dendritjét vizsgáltuk meg. 3 független kísérletező „vakon” végzett számolása eredményeként összesen 78764 db dendrittüskét detektáltunk.

Kétoldali carotis communis okklúzió (2VO) az in vitro elektrofiziológiához és szövettanhoz:

A teljes agyat érintő átmeneti hipoperfúziós állapot előidézéséhez a kétoldali carotis communisokat (CCA) zártuk el (Tsuchiya és mtsai., 1992; Tsuchiya és mtsai., 1993) reverzibilis módon. Az állatokat először 10 ml/ ttkg dózisu, intraperitoneálisan alkalmazott 4%-os klorál-hidrát oldattal altattuk el. A műtét során az állatok testhőmérsékletét állandó értéken ($37\pm 0,5$ °C) tartottuk egy feedback-szabályozott infralámpa segítségével. A preparálás során a legkevesebb vérzést okozva, tompán boncolva feltártuk a CCA-kat, eltávolítottuk az erekkel együtt futó vagoszimpatikus idegköteget, cérnára vettük az artériákat, majd végül sérülést nem okozó aneurizmás csipesszel (Aesculap, B. Braun) 30 percre elzártuk azokat. A fél óras érelzárást követően eltávolítottuk a csipeszeket, ezáltal elindítottuk a reperfúziót az állatok agyában. A több napos felépülési idő miatt a műtét során keletkezett sebet antibiotikummal (Strepto-Fatol, FATOL Arzneimittel GmbH) kezeltük az esetleges fertőzések elkerülése érdekében, végül a sebet varrással bezártuk. Az álműtött kontroll (sham control, s.c.) csoportba tartozó patkányokon a fent leírt folyamatokat hajtottuk végre CCA okklúzió nélkül. A műtétek, illetve az azt követő regenerációs idő alatt 20%-os mortalitást tapasztaltunk az állatoknál, amely valószínűleg az altatás és/vagy a műtéti beavatkozás során fellépő nem várt mellékhatásoknak tudhatók be.



13. ábra A: Az arteria carotis communisok (CCA) elhelyezkedését bemutató rajz (Farkas és mtsai, 2002; alapján módosítva). **B:** A leszorításra váró kiproparált és fonálra fűzött carotisok.

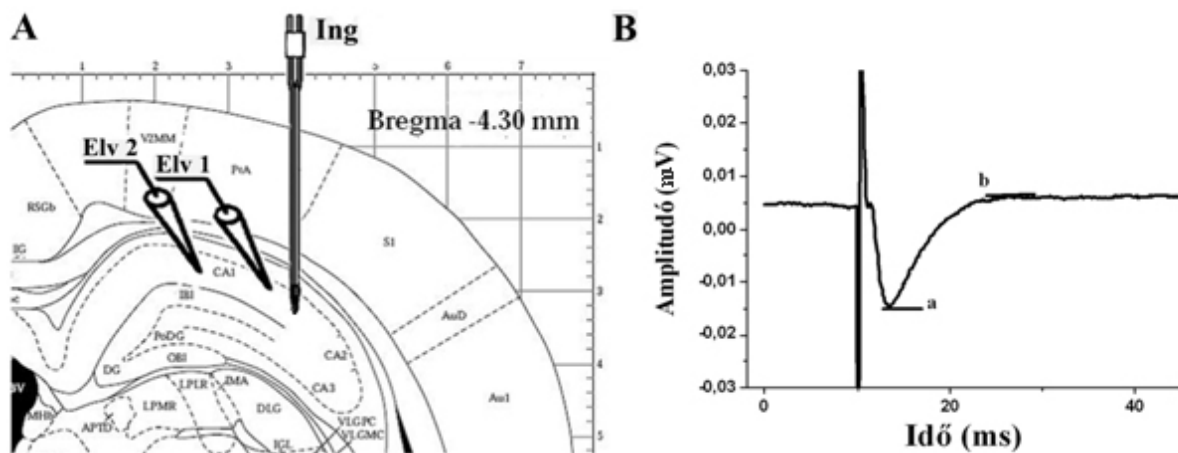
In vitro elektrofiziológia:

A globális hipoperfúzió káros hatásait a szinaptikus plaszticitásra (LTP indukálhatóság) és az alapvető szinaptikus jeltovábbításra (I/O görbe) túlélő, akut agyszeleteken vizsgáltuk. A vizsgálatok célpontjával a hippocampus CA1-es régióját választottuk, mivel ez a terület az egyik legérzékenyebb az ischaemiás állapotokra. A túlélő agyszeletek elkészítéséhez az állatokat dekapitáltuk, majd egy hosszanti vágás után szétnyitottuk az állatok fejbőrét, hogy láthatóvá váljanak a tájékozódást segítő varratok a koponyatetőn. A koponyán óvatos bemetszést végeztünk a sagittális varrat és két további bemetszést a coronális varrat mentén, ezáltal a koponyatetőt széttárhatjuk az agy sérülése nélkül. Egy sebészeti szike segítségével coronális metszéseket ejtettünk a bulbusok mögött és a kisagy előtt, hogy eltávolíthassuk az agy hippocampust tartalmazó régióját. Vibratómmal (Campden Instruments, Egyesült Királyság) a hippocampus középső régiójából 350 µm vastagságú coronális agyszeleteket készítettünk. A metszést jéghideg, 2-3 °C-os mesterséges cerebrospinális folyadékban (aCSF) végeztük, amelynek az összetevői mM-ban megadva: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄ és 10 D-glükóz. A regisztráló oldat összetétele ettől némileg eltérő: 3 mM CaCl₂-t és 1,5 mM MgSO₄-et tartalmaz. A metsző oldatban található alacsonyabb Ca²⁺ és magasabb Mg²⁺ ion koncentráció, azért szükséges hogy lelassítsuk ill. megakadályozzuk a metszés során okozott fizikai sérülés következtében elinduló nekrotikus és apoptotikus folyamatok kialakulását. A metszés és a regisztrálás alatt alkalmazott aCSF-et karbogénnel (95% O₂, 5% CO₂) oxigenáltattuk, hogy a szeletek gázanyagcsereje zavartalan legyen. A túlélő agyszeleteket egy Haas-típusú regisztráló interface kamrába helyeztük, és szobahőmérsékleten pihentettük. A regisztráló kamrában a folyamatos perfúziót, azaz az oxigén és tápanyagellátást, valamint a keletkező anyagcsere termékek eltávolítását az élő agyszelet környezetéből, egy perfúziós pumpa végezte. Az aCSF áramlási sebességét 1,5 ml/percre állítottuk be. A regisztrálás ideje alatt a szeleteket 34 °C-on, páradús környezetben tartottuk. A Schaffer-kollaterálisok orthodromikus ingerléséhez egy bipoláris, koncentrikus fém elektródot használtunk (Neuron elektród kft; Budapest, Magyarország), amelyet a CA1-es régió stratum radiatum rétegébe helyeztünk (14. ábra). Az ingerlés állandó áramerősség mellett, 0,2 ms-os impulzusokkal 0,033 Hz frekvencián történt (WPI-A310 Accupulser, Sarasota, Florida, USA).

A kiváltott serkentő poszt-szinaptikus mező potenciálokat (fEPSP) a hippocampus CA1-es régiójának stratum radiatum rétegéből vezettük el (14. ábra). A regisztrálás 1-2 MΩ ellenállású regisztráló aCSF-fel feltöltött üveg mikroelektródokkal történt. Az ingerlő stimulus

intenzitását úgy határoztuk meg, hogy a posztszinaptikus membránon található NMDA receptorok is aktiválódnak a szinaptikus jeltovábbításban. Ennek eléréséhez a szeletekben maximális amplitúdójú fEPSP-t kiváltó legkisebb impulzus értékének kb. 80-90%-át használtuk (átlagosan 40-70 μ A közötti érték).

A fEPSP-eket erősítővel (Experimetria, AMP-04) amplifikáltuk, majd a külső környezetből származó zavaró elektromos jelek szűrése (alsó határ, LF: 1 Hz; felső határ, HF: 3 kHz) után, analóg-digitális konverterrel (Experimetria; AIF-03) digitalizáltuk. A regisztrált adatokat számítógépen jelenítettük meg a kísérletek alatt, és tároltuk a későbbi kiértékeléshez. Az elmentett regisztrátumok kiértékelését az OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) szoftver segítségével végeztük. A CA1-es régióban található neuronok apikális dendritje és a Schaffer-kollaterálisok közötti szinapszisokban az LTP indukcióhoz HFS-t (Rose és Dunwiddie, 1986) alkalmaztunk. A HFS során 5 másodpercig adtuk a 0,2 ms jelszélességű impulzusokat 100 HZ frekvenciával. A regisztrálás megkezdése előtt minden esetben a szeleteket 45-60 percen keresztül pihentettük kontroll ingerlés mellett (0,2 ms-os impulzusok, 0,033 Hz frekvencián), amíg meg nem szűnt a kezdeti szakaszra jellemző enyhe facilitáció, és stabilizálódtak a fEPSP-k amplitúdói. Ezt követően egy 10 perces kontroll szakasz felvétele következett, amelyet követett a HFS alkalmazása. Az LTP indukciója után a fEPSP-k amplitúdóinak változásait 60 percen keresztül regisztráltuk.



14. ábra A: Az *in vitro* elektrofiziológiai méréseknél (LTP indukció, I/O görbe) alkalmazott ingerlő (Ing) és elvezető (Elv1, Elv 2) elektródák pozíciója a hippocampus CA1-es régiójában, a stratum radiatumban. **B:** Egy fEPSP-t ábrázoló regisztrátum. Az amplitúdók nagyságát az a és a b pontok között mértük meg a SPEL advanced Intrasyss szoftver segítségével.

Az I/O görbék (input/output, bemenet/kimenet) felvétele az alapvető glutamáterg szinaptikus működés jellemzésére alkalmas. Ezekben a mérésekben a különböző kísérleti

állatcsoportok fEPSP amplitúdó értékeit ábrázoltuk különböző ingerlési áramerősség alkalmazása mellett. Az ingerlő impulzus értékeit 0 μA -tól 100 μA -ig változtattuk 5 μA -es lépésközökkel. Egy állatból származó agyszeletekből egy típusú méréshez (LTP és/vagy I/O görbe) maximum két szeletet használtunk fel, annak érdekében, hogy a mintavételezés kellő mértékben reprezentatív legyen. Továbbá ez lehetővé tette az egy csoportba tartozó állatok között jelentkező egyéni varianciák kiküszöbölését.

Golgi-Cox festés:

A hippocampus CA1-es régiójának neuronjain található dendrittüske (spine) szám és sűrűség meghatározásához Golgi-Cox festést alkalmaztunk (15. ábra, A). Az állatokat dekapitáltuk, és a festéshez a hippocampust is tartalmazó, hozzávetőlegesen 3-4 mm vastag coronális metszésű agydarabot eltávolítottuk az *in vitro* elektrofiziológiai alfejezetben taglaltak szerint. Ezt a blokkot 10 napra Golgi-Cox festőoldatba helyeztük és szobahőmérsékleten (22-23 °C) tartottuk sötétben. A festőoldat 3 törzsoldatból tevődik össze A, B és C. A: 5%-os káliumbikromát, B: 5%-os higany-klorid, és C: 5%-os kálium-kromát, mindhárom anyag desztillált vízben (DW) oldva. Az egyes törzsoldatokat Glaser és Van der Loos szerint hígítottuk, és kevertük össze Golgi-Cox festőoldattá (Glaser és Van der Loos, 1981). Röviden: 5-5 térfogategység A és B oldatot összekevertünk, majd 4 térfogategység C oldatot kevertünk el 10 egység DW-el. Ezt követően az AB keveréket lassan, folyamatos üvegbottal történő kevergetés mellett öntöttük össze a hígított C oldattal, mindezt sötétített helyiségben. A kész elegyet sötét üvegben minimum 5 napig öregítettük a felhasználás előtt. Ezen idő alatt a tárolóüveg alján kevés csapadék válik ki, amelyet elkerülve a festéshez mindig a tiszta felülúszót használtuk. A festőoldatot 2-3 naponta lecseréltük az agydarabokon, hogy csökkentsük a kiváló csapadék által okozott háttérfestődés mértékét.

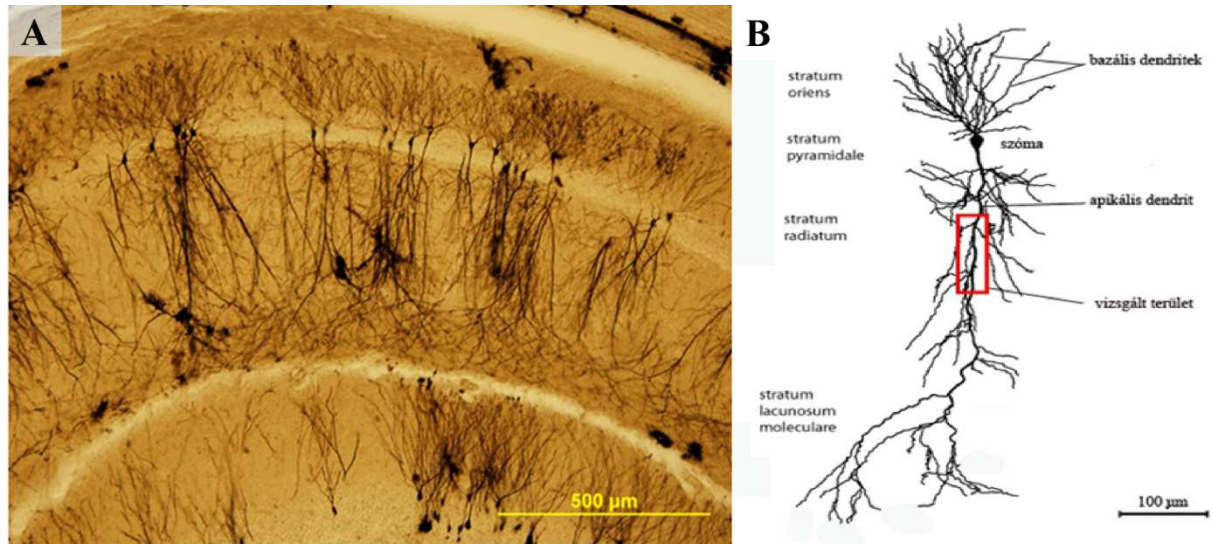
Amikor az impregnáció elkészült az agyblokkot minimum 2-3, maximum 30 napra 30%-os szacharóz oldatba helyeztük és hűtőben (4 °C) tároltuk. Ez a lépés elősegíti, hogy később az agyszeletek rugalmasabbak maradjanak, és ne töredezzenek szét megszáradás után. Amikor az agyszegmensek lesüllyedtek a szacharóz oldatot tartalmazó edény aljára, 100 μm vastag agyszeleteket készítettünk vibratóm (Leica VT1000S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Németország) segítségével. A hippocampus középső régióját tartalmazó szeleteket 6%-os szacharóz oldatban gyűjtöttük össze, és húztuk fel zselatinózott (2%) üveg

tárgylemezre. Ezután szűrőpapír darabot helyeztünk a felhúzott szeletekre majd egy másik tárgylemez segítségével enyhe nyomást fejtettünk ki a metszetekre hogy az agyszeletek biztosan felragadjanak a tárgylemezre. Ezt követően a metszeteket egy éjszakán át sötét párasító kamrában tartottuk.

Másnap a metszeteinket festőkádba helyeztük, majd Gibb és Kolb (1998) szerint végeztük az előhívást:

1. Mosás DW-el (1 perc).
2. Tömény (30%) ammónium-hidroxidba (Spektrum 3D) helyezés 30 percre, sötétben.
3. DW-es mosás (1 perc).
4. Fixálás Kodak Fix (Eastman Kodak Company) oldatban 30 percig, sötétben.
5. Víztelenítés felszálló alkohol sorban (50%-os alkohol 1 perc, 70%-os alkohol 1 perc, 96%-os alkohol 1 perc, abszolút alkoholban 2x5 perc, végül xylol 10perc).
6. Lefedés fluoromounttal.

A kész előhívott metszeteket 24 óráig szabad levegőn száradni hagytuk a fénymikroszkópos vizsgálatok előtt.



15. ábra A: Golgi-Cox festéssel megjelenített neuronok a hippocampus CA1-es régiójában (120x-os nagyítás). Egy 100 µm vastagságú coronális agyszelet CA1-es régiójában átlagosan 30-35 db piramissejt jelölődik meg. **B:** Egy CA1-es neuron sematikus ábrázolása a hippocampális rétegekkel. Az általunk vizsgált 100 µm hosszúságú szakaszt az apikális dendrit proximális és disztális területe között piros négyzettel jelöltük.

Kvantitatív analízis:

A tiszta Golgi metszeteket fénymikroszkóppal (Olympus BX51, Tokió, Japán) morfológiai vizsgálatoknak vetettük alá, amelyekhez olaj immerziós objektíveket használtunk. A tanulmányhoz minden szövettani vizsgálatnak alávetett kísérleti állatcsoportból 20-20 sejtet használtunk. A hippocampus CA1-es régiójába tartozó neuronok dendrittüskéinek (spine) sűrűségét analizáltuk az apikális dendriteken. A méréseket minden esetben ugyanazon a területen, a proximális és disztális apikális dendritikus régió között egy 100 µm-es szakaszon végeztük (a sejtestől 100-200 µm, 15. ábra, B). Azért választottuk ezt a speciális területet vizsgálataink célpontjául, mert a Schaffer-kollaterálisok ebben a régióban szinaptizálnak a CA1-es neuronok dendritjein található tüskékkel. Az LTP indukciós méréseink során használt elvezető elektródáinkat is hasonló okokból pozícionáltuk ugyanezen területre. A vizsgálandó apikális dendriteket egy 100x-os nagyítású olaj immerziós objektív alatt választottuk ki, és a látómezőt a vizsgálandó szakaszra állítottuk. A fénymikroszkóphoz kapcsolt kamera segítségével sorozatfelvételeket készítettünk úgy, hogy a vizsgálandó terület minden szakasza legalább 1 felvételen fókuszba kerüljön. A számítógépre mentett sok részből álló egy dendritet ábrázoló mikroszkópos fotókat később egy speciális szoftver (ImageJ 1.42q, National Institutes of Health, USA) segítségével egy képfájlba illesztettük össze. A dendrittüskék számolását szintén az előbb említett programmal végeztük. A képeket egy munkatársunkkal kódoltattuk, majd összekevertettük, így a számolásokat 3 független ember „vakon” végezhetette el.

Kainsav kezelés:

Az elektrofiziológiai és/vagy morfológiai kísérletek során KA kezelésben részesült állatok minden esetben 5mg/ttkg dózisban és 1 ml végtérfogatban kapták a hatóanyagot intraperitoneálisan (i.p.) alkalmazva. Az alkalmazott dózist a kainsavval kapcsolatos irodalmi adatok és a saját előkísérleteink alapján határoztuk meg. Az előkísérleteink során a 10 mg/ttkg-os dózis az esetek 100%-ában letálisnak bizonyult, a 7 mg/ttkg-os dózis pedig az állatok felénél epileptikus görcsrohamot okozott. KA-t fiziológiás sóoldatban oldottuk fel.

Alkalmazott statisztikai módszerek:

A fEPSP-k amplitúdóit a HFS előtti 10 perces kontroll szakaszhoz, mint 100%-hoz normalizáltuk az LTP indukálhatóságra vonatkozó méréseinkben. Az adatok statisztikai analíziséhez a két független mintán végzett nem-parametrikus tesztet (Mann-Whitney U-teszt) végeztük el. Az I/O görbék statisztikai analíziséhez a Cruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk.

A morfológiai méréseinknél a dendrittüske szám csoportok közötti különbségeinek vizsgálatához a parametrikus két független mintás t -tesztet használtuk. A statisztikai számításokat az SPSS 10.0 for Windows (SPSS inc., Chicago, USA) program segítségével végeztük el. Minden esetben a $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ és a $P \leq 0,001$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

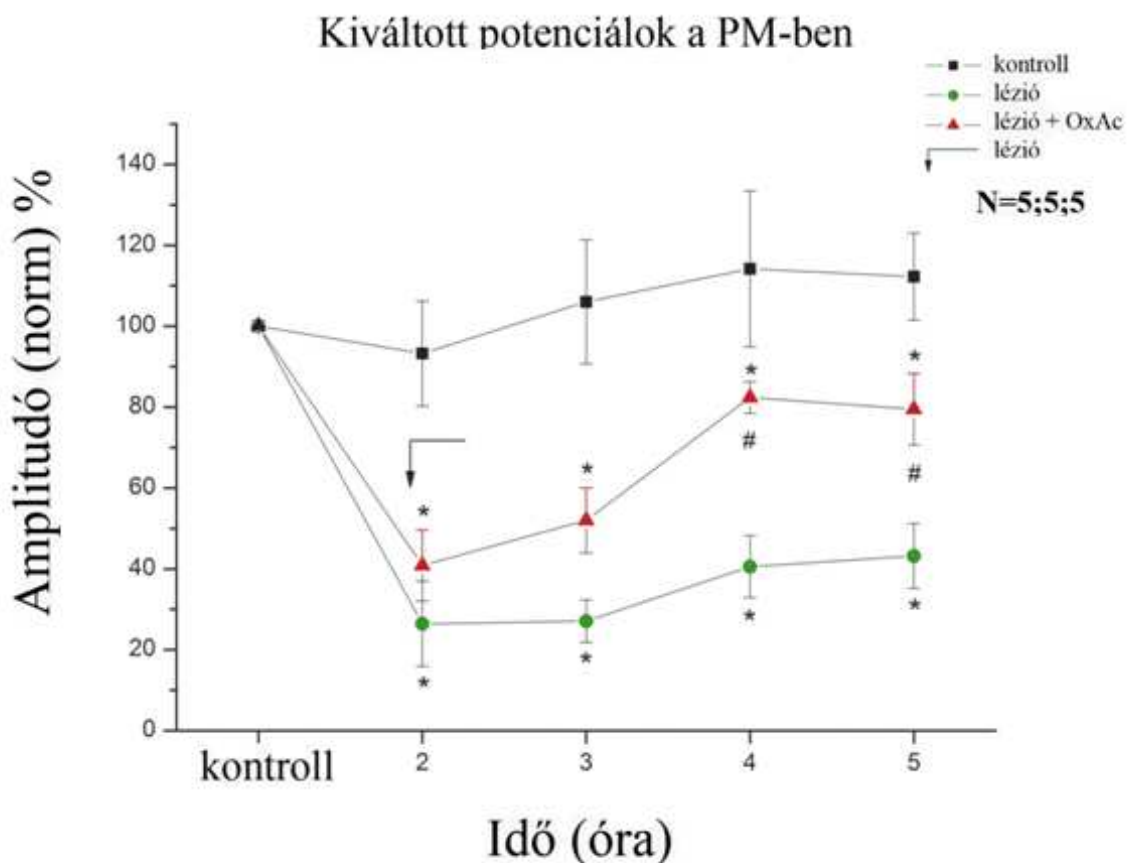
A fokális ischaemia modell kísérletsorozatainak eredményei

In vivo elektrofiziológia:

A fototrombózis által előidézett akut, fokális ischaemiás állapot agyműködést érintő káros hatásainak vizsgálatához az álműtött kontroll állatok agykérgéről elvezetett kiváltott válaszok értékei szolgáltatják az összehasonlítási alapot. Ezekben az állatokban a *punctum maximum* pontban és az ettől rostrálisan és caudálisan elhelyezkedő 3-3 mérőpontban is, a kiváltott válaszok amplitúdói enyhe facilitációt mutattak a 4 órán keresztül zajló regisztrálás során (16. ábra: kontroll). Ez a nem jelentős (5-10%-os) amplitúdó-növekedés a statisztikai analízis alapján nem adódott szignifikánsnak, a kísérletek harmadik órájában meg is szűnt, és az értékek stabilizálódtak.

A fototrombotikus lézió azonnal bekövetkező, jelentős amplitúdó csökkenést okozott a *punctum maximum*-ban (16. ábra) és a többi koordinátán egyaránt (17. ábra). A kiváltott válaszok értékei a 100%-nak tekintett kontroll szakaszhoz viszonyítva 70-75%-al visszaestek közvetlenül a megvilágítás után. Az elvezetett biológiai potenciálok amplitúdói azonban spontán javulást mutattak, és az ischaemiás inzultust követő második órában a kontroll értékek 40-43%-ánál stabilizálódtak a kísérletek végéig (16. ábra).

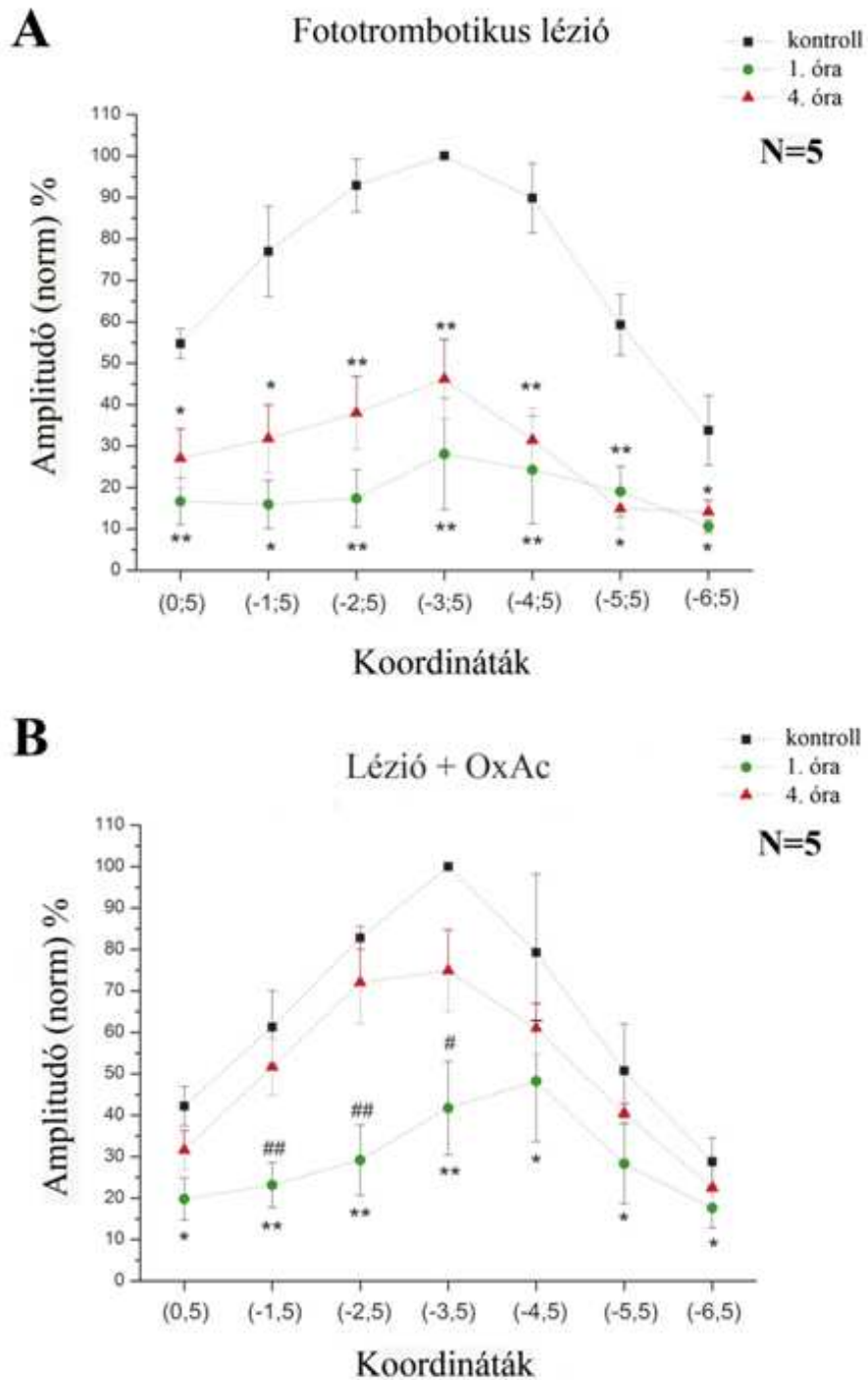
Közvetlenül a lézió kiváltását követően OxAc kezelésben részesült állatok kiváltott válaszainak értékei a kezeletlen csoporthoz viszonyítva kevésbé, 55-60%-al csökkentek a PM-ban a kontroll periódushoz képest. Ezt követően a potenciálok amplitúdói jelentős javulást mutattak, és a megvilágítást követő második-harmadik órában a kontroll értékek 78-80%-át is elérték. Ez a funkcionális javulás a méréseink utolsó 2 órájában szignifikánsan jobbnak bizonyult a PM-ban a lézió átesett kezeletlen csoporthoz képest (16. ábra).



16. ábra A kiváltott válaszok normalizált amplitúdó értékeinek alakulása az idő függvényében a *punctum maximum* pontban. A százalékban kifejezett változásokat az álműtött kontroll (kontroll), fototrombotikus lézió átesett kezeletlen (lézió) és lézió átesett OxAc kezelésben részesült (lézió + OxAc) csoportokban a kontroll szakaszhoz, mint 100%-hoz viszonyítottuk. Átlag \pm S.E.M. * szignifikáns különbség az álműtött kontroll csoporthoz viszonyítva; # szignifikáns különbség a lézió átesett kezeletlen és kezelt csoportok között.

*,#: $P \leq 0,05$.

A kiváltott válaszok amplitúdói a PM-től (-3;5) rostrális vagy caudális irányban távolodva fokozatosan csökkentek. A fototrombotikus lézió átesett kezeletlen és OxAc kezelt csoportban is a lézió által kiváltott funkcionális károsodás és az azt követő javulás mértéke, arányaiban hasonlóan bizonyult a PM pontban mért változásokhoz minden vizsgált koordinátán (17. ábra A-B). A 17. ábrán mutatjuk be a különböző koordinátákon mért amplitúdó értékeket a léziót szenvedett kezeletlen (A) és OxAc kezelt csoportokban (B).



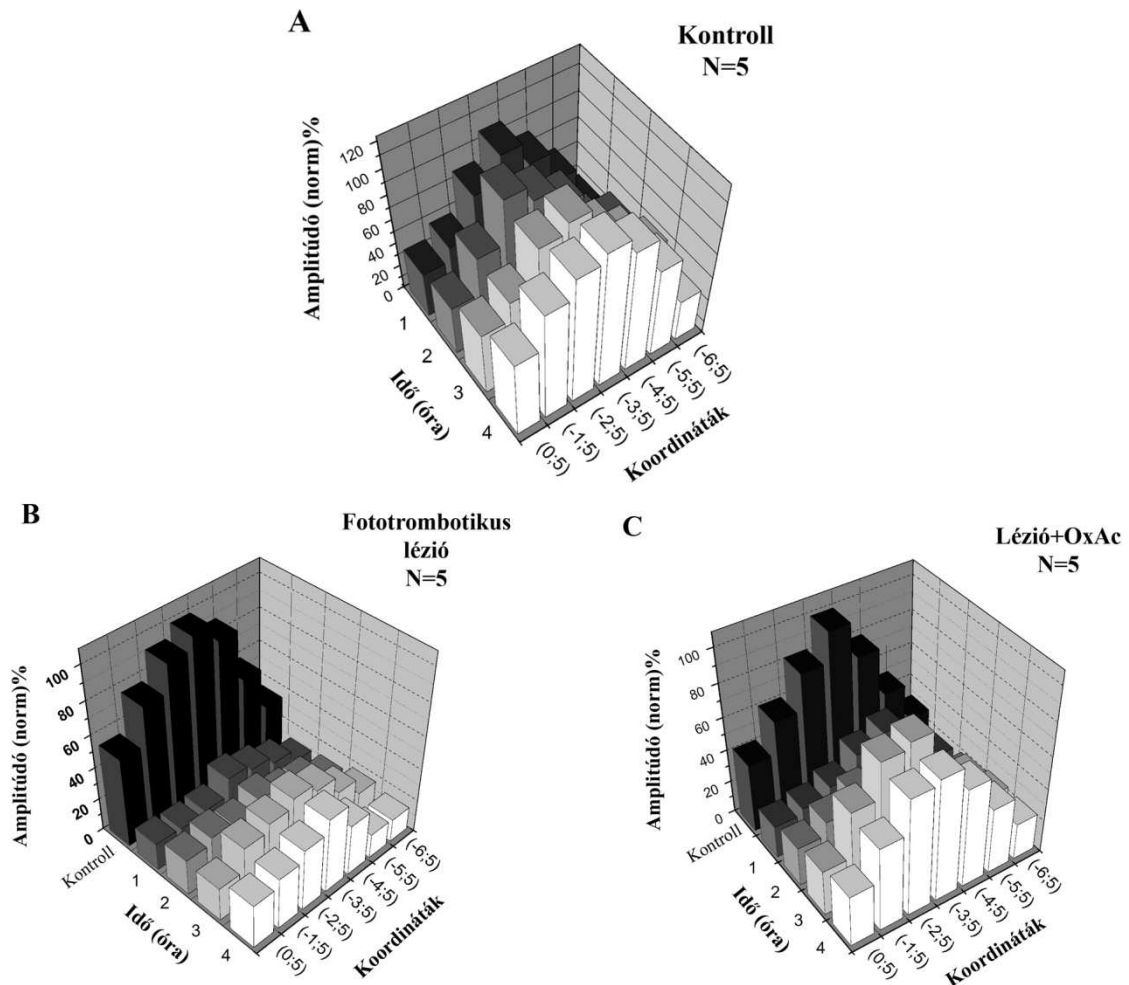
17. ábra Az elektromos ingerléssel kiváltott szomatoszenzoros válaszok normalizált amplitúdói 7 különböző koordinátán regisztrálva. **A:** Kiváltott válaszok változása a fototrombotikus lézió után, kezeletlen csoportban. **B:** Kiváltott válaszok alakulása a lézió után OxAc kezelt csoportban. Átlag \pm S.E.M.
* Szignifikáns különbség a kontroll periódushoz képest; # szignifikáns különbség a megvilágítást követő 1. és 4. órában mért adatok között. *,#: $P \leq 0,05$; **,##: $P \leq 0,01$.

A regisztrált adatokat az összehasonlíthatóság érdekében a kontroll periódusban mért a PM-ből elvezetett értékekhez, mint 100%-hoz normalizáltuk. A grafikonokon az ischaemiás inzultust megelőző intakt (kontroll) állapotot, valamint a megvilágítás utáni 1. és 4. órában

regisztrált amplitúdó értékeket mutatjuk be. A lézió átesett kezeletlen csoportban a megvilágítás után mind a 7 különböző koordinátán számottevő csökkenést tapasztaltunk az elektromos ingerléssel kiváltott biológiai válaszokban. A 4. óra végére a legtöbb koordinátán megfigyelhetünk egy enyhe funkcionális javulást, de az eredmények még így is minden vizsgált pontban szignifikánsan rosszabbak a kontroll periódusban tapasztaltakhoz képest (17. ábra A). A lézió után OxAc kezelésben részesült csoportban egyrészt kisebb mértékű redukció történt az ischaemiás inzultust követően, másrészt a 4. óra végére a kiváltott potenciálok amplitúdói a legtöbb vizsgált pontban elérték a kontroll periódus 70-80%-át. Ezek az adatok már nem térnek el szignifikáns mértékben a kontroll szakaszban regisztrált értékektől. A javulás mértéke a kísérletek végére a PM-ban és a rostrális irányban további két koordinátán szignifikánsnak adódott a megvilágítás utáni 1. órához viszonyítva (17. ábra B).

A minden változót (amplitúdó, idő, koordináták) egyszerre megjelenítő 3 dimenziós grafikonokon a regisztrált adatok számértékeit az ischaemiás inzultus előtti kontroll szakaszban regisztrált, PM-ból elvezetett kiváltott válaszokhoz normalizáltuk (18. ábra A-C).

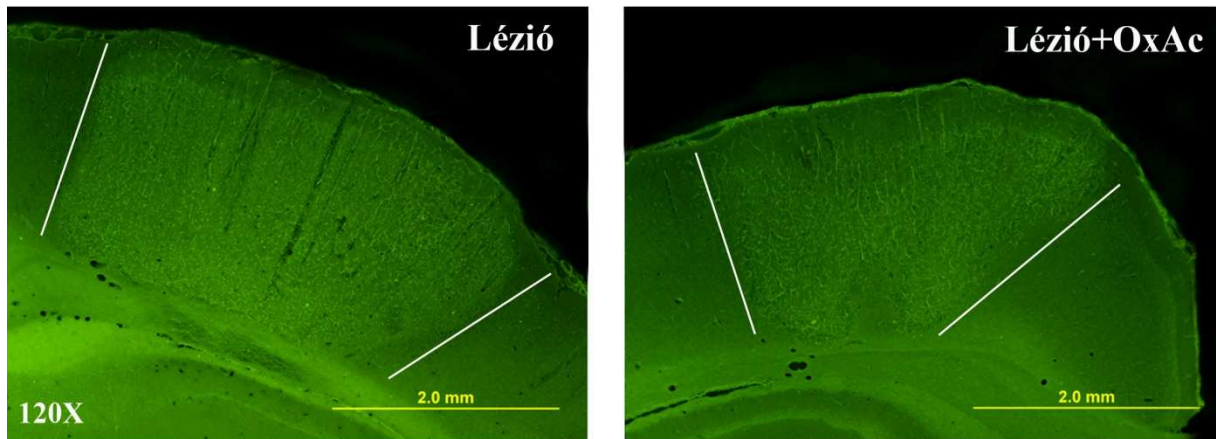
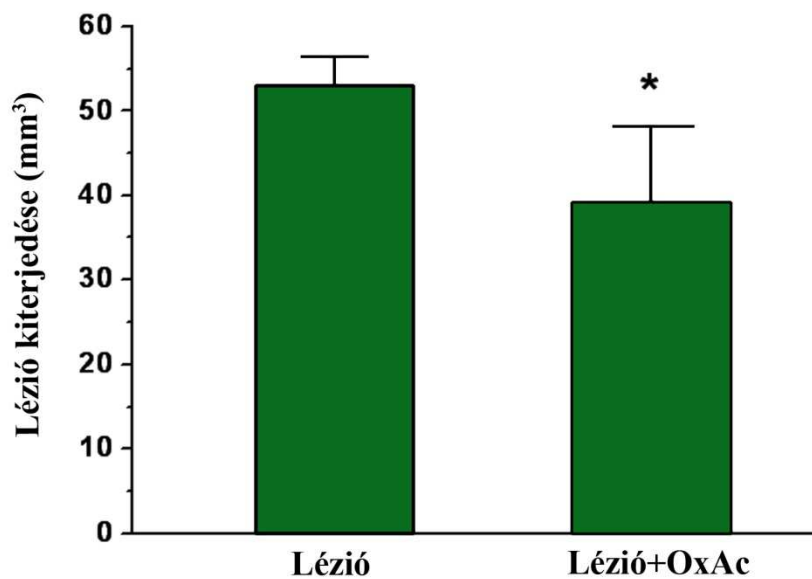
A kontroll csoportban jól megfigyelhető az idő előrehaladtával bekövetkező enyhe (nem szignifikáns) facilitáció, valamint az, hogy a PM-tól rostrálisan vagy caudálisan egyre távolodva az elvezetett amplitúdó értékek lépcsőzetesen csökkennek (18. ábra A). A másik két csoport eredményeit bemutató grafikonok egyértelműen szemléltetik azt, hogy a megvilágítást követő nagyfokú amplitúdó-csökkenést a lézió után OxAc kezelést kapott csoportban egy jóval határozottabb funkcionális javulás követi a kezeletlen csoporthoz képest. Ez a jelentős javulás az inzultust követő 3. illetve 4. órában a legtöbb koordinátán elérte a kontroll értékek 70-80%-át a kezelt csoportban. Ugyanez a javulás a kezeletlen csoport tagjai között a kontroll értékek mindössze 40-45%-át érte csak el (18. ábra B-C).



18. ábra A kiváltott válaszok amplitúdóinak százalékos változásai az összes koordinátán az idő függvényében. **A:** Az álműtött kontroll csoportba tartozó állatokban regisztrált amplitúdók százalékos változásai. Az amplitúdók alakulása az ischaemiás inzultus előtt (Kontroll), illetve azt követően 4 órán át regisztrálva a lézió n átesett kezeletlen (**B**) és OxAc kezelt (**C**) csoportokban.

Hisztológia:

A Fluoro-Jade B festéssel megjelenített, zölden fluoreszkáló elhalt vagy sérült idegsejtek fénymikroszkóp alatt vizsgálva jól körülhatárolható léziót jelenítenek meg a sorozatmetszeteken (19. ábra A). A teljes léziót felölelő sorozatmetszeteket gondosan sorbarendeztük, és végigvizsgálva megállapítottuk a teljes lézió kiterjedését mm³-re vonatkoztatva a fototrombotikus lézió n átesett kezeletlen (Lézió) és a lézió után OxAc kezelt (Lézió+OxAc) csoport állataiban egyaránt (19. ábra B).

A**Fluoro-JadeB festés****B**

19. ábra A: A fototrombotikus úton előidézett fokális ischaemia után kialakuló léziók megjelenítése Fluoro-JadeB festés segítségével 120x-os nagyításban. A reprezentatív fotókon zölden fluoreszkálnak az elhalt és sérült idegsejtek, amelyek így jól körülhatárolhatóvá teszik a sérült agyterületet (fehér vonalak közötti terület). A megvilágítás utáni OxAc kezelés (Lézió+OxAc) szemmel láthatóan csökkentette a léziók kiterjedését a kezeletlen (Lézió) csoportban tapasztaltakhoz képest. **B:** A lézió kiterjedésének számszerűsített, mm³-re vonatkoztatott adataiból származó oszlopdiagramm. Az ischaemiás inzultust követően OxAc kezelésben részesült csoportban (Lézió+OxAc) szignifikánsan kisebb kiterjedésű léziókat tapasztaltunk a kezeletlen (Lézió) csoporthoz viszonyítva. Átlag±S.E.M. * P≤0,05. Lézió: N=12 (2448 agyszelet), Lézió+OxAc: N=8 (1536 agyszelet).

A Bengal Rose keringésbe jutásával és a hajszálérhálózat lokális megvilágításával előidézett ischaemiás állapot minden esetben több milliméter kiterjedésű, jól körülhatárolható léziókat okozott (19. ábra A). Az inzultust követő közvetlen OxAc kezelés (Lézió+OxAc) azonban a léziók térfogatát jelentősen, hozzávetőlegesen 30%-al redukálta a kezeletlen

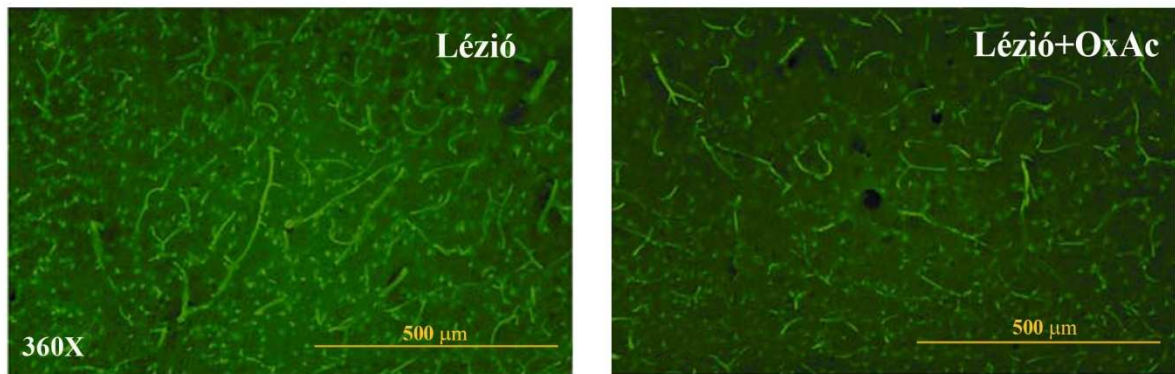
(Lézió) csoporthoz képest. Ez a különbség a statisztikai analízisek alapján szignifikánsnak bizonyult.

A sérült neuronok számolását nagyobb nagyításban (360x; 600x) készített fotókon végeztük el. A 360x-os nagyítású képeken váratlanul szembetűnnek fluoreszkáló kapillárisok (20. ábra A), amelyek meglepőek, hiszen a FJB festés jól ismert arról, hogy magas szelektivitást mutat a sérült és/vagy elhalt agysejtekre. A legkézenfekvőbb magyarázatnak az tűnik, hogy a fluoreszcens aktivitás nem a FJB festésnek köszönhető, hanem annak, hogy a fény aktiválta vérlemezke-aggregáció következtében a hajszálerekbe szorult vörösvértesteknek megváltoztak a fluoreszcens tulajdonságai. A keringésbe jutott Bengal Rose oldat jól ismert arról, hogy fény által aktiválva szinglet-oxigén képzés útján peroxidálja a különböző sejtes elemeket (Girotti és mtsai., 1985; Rozanowska és mtsai., 1999; Wright és mtsai., 2003). Az eritrociták peroxidációjának következtében megnő azok fluoreszcens aktivitása az 520 nm-es tartományban, 460 nm-es gerjesztőfény mellett (el-Rahman és mtsai., 1995; Nagababu és Rifkind, 1998; Nagababu és Rifkind, 2004). Ezek a spektrális tulajdonságok majdnem azonosak a FJB festésre jellemzőekkel (525 nm kibocsájtott, 470-490 nm gerjesztő fény). Összehasonlítva a fototrombotikus lézió átesett kezeletlen állatból származó fotót (20. ábra A, Lézió) a megvilágítás után OxAc kezelt állatéval (20. ábra A, Lézió+OxAc) jól látható az, hogy a kezelt állatban a kapillárisok sokkal kisebb szakaszokban fluoreszkálnak. Ez feltételezéseink szerint jobb vérellátásra utal a kezelt csoportban, de ahhoz hogy biztonsággal kijelenthessük ezt, közvetlen véráramlás mérések lennének szükségesek, amit nem végeztünk a kísérleteink során.

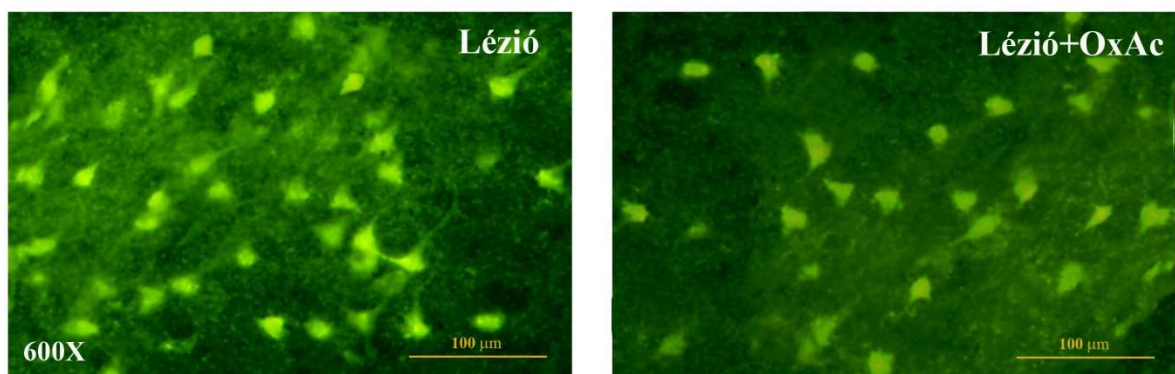
A nagyobb (600X) nagyítás mellett még könnyebben azonosíthatók a zölden fluoreszkáló FJB pozitív idegsejtek (20. ábra B), amelyek sérülést szenvedtek vagy elhaltak a fototrombotikus lézió következtében kialakult oxigén és tápanyaghiány hatására. A pontos sejtszámolási adatok megerősítették azt, amit a lézió térfogatára vonatkozó méréseinknél tapasztaltunk. Az OxAc kezelés (20. ábra B, Lézió+OxAc) közvetlenül a megvilágítás után alkalmazva szemmel láthatóan csökkentette a sérült és/vagy elhalt neuronok számát a kezeletlen (20. ábra B, Lézió) csoporthoz viszonyítva. A 20. ábra C blokkjában mm^2 -re vonatkoztatva ábrázoltuk oszlopdiagramon a sejtszámolási adatokat. Az OxAc kezelés jelentősen, körülbelül 30%-al csökkentette a FJB+ sejtek számát a kezeletlen csoporthoz viszonyítva. Ez a különbség a statisztikai analízis alapján szignifikánsnak bizonyult.

Fluoro-JadeB

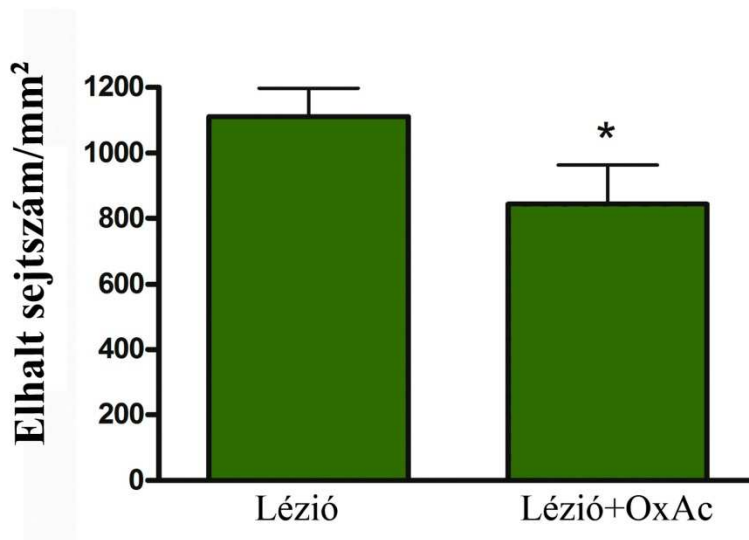
A



B



C



20. ábra A-B: A FJB festéssel készült reprezentatív felvételek a fototrombotikus lézió után átesett kezeletlen (Lézió) és a lézió után OxAc kezelt (Lézió+OxAc) csoportból. A 360x-os nagyítású fotókon (A) a kezeletlen csoportban nagyobb a kezelt csoportban kisebb számú fluoreszkáló kapillárist láthatunk. A 600x-os nagyítású felvételeken (B) jól azonosíthatók a zölden fluoreszkáló elhalt és/vagy sérült FJB+ sejtek, amelyeket a kezeletlen (Lézió) csoportban nagyobb, az OxAc kezelt (Lézió+OxAc) csoportban kisebb számban találunk. **C:** A FJB+ sejtek számának alakulása a léziót szenvedett kezeletlen (Lézió) és kezelt (Lézió+OxAc) csoportban. Átlag± S.E.M. * $P \leq 0,05$ Lézió: $N=12$ (2448 agyszelet); Lézió+OxAc: $N=8$ (1536 agyszelet).

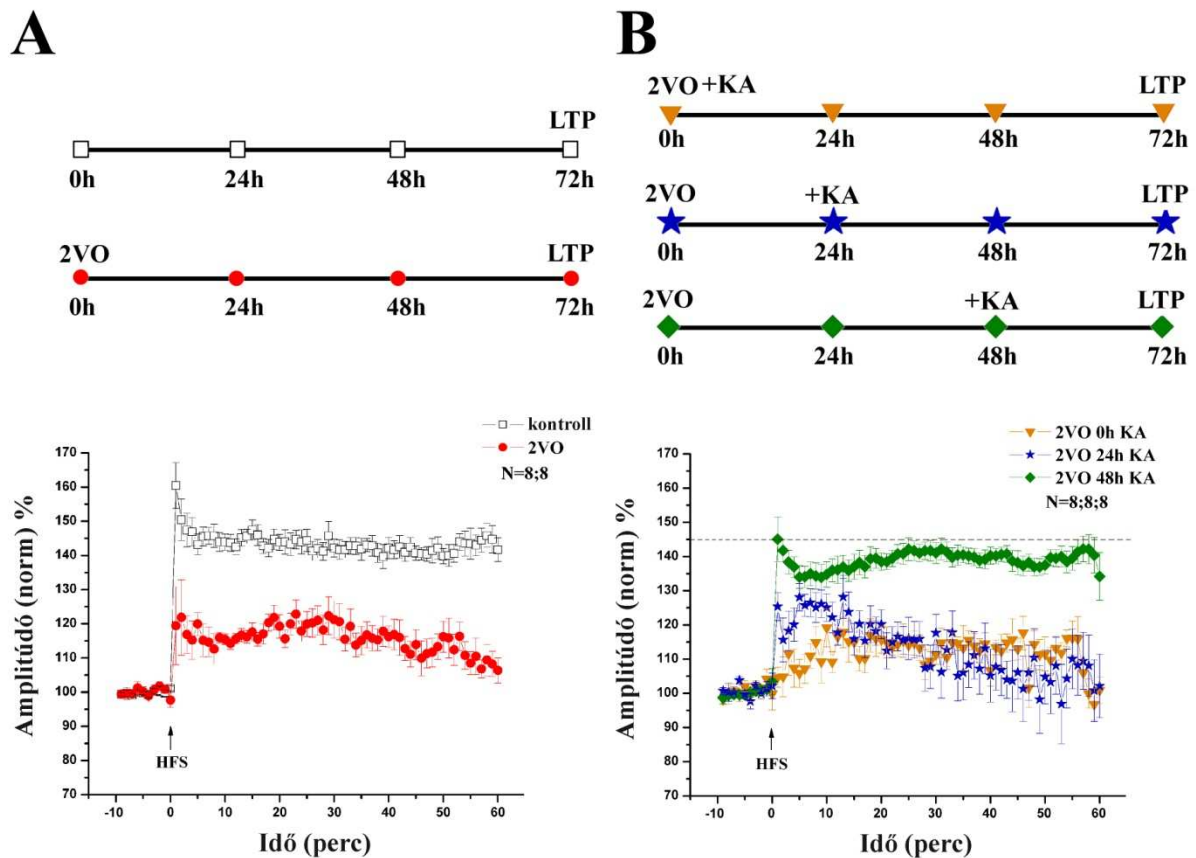
A globális hipoperfúziós modell kísérletsorozatának eredményei

In vitro elektrofiziológia:

LTP indukálhatóság:

A Shcaffer-kollaterálisok magas frekvenciás ingerlése (HFS) jelentős, körülbelül 45%-os fEPSP amplitúdó-növekedést eredményezett a kontroll csoportba tartozó állatokban (21. ábra A, kontroll). Ez a növekedés az LTP indukciót követő 1 órás regisztrációs periódus alatt tartósan fennmaradt. A 30 percig tartó globális hipoperfúzió 3 napos túlélést követően jelentősen rontotta a szinaptikus plaszticitást, mivel a HFS-t követően jóval kisebb mértékű, mindössze 15-20%-os amplitúdó-növekedést tapasztaltunk (21. ábra A, 2VO). A kialakult, kevésbé jelentős potencírozódás sem maradt fenn stabilan, hiszen a fEPSP-k amplitúdói az 1 órás regisztrációs periódus alatt folyamatosan csökkenő tendenciát mutattak. Ezek az adatok jól összeegyeztethetők a munkacsoportunk korábbi eredményeivel (Marosi és mtsai. 2009). A kainsavas poszt kondicionálás esetleges neuroprotektív hatásait 3 különböző időpontban is megvizsgáltuk az ischaemiás inzultust követően (utókezelés a 2VO-t követő 0., 24. és 48. órában; 21. ábra B). A hipoperfúziót követő közvetlen kainsavas kezelés (2VO 0h KA) rontotta az LTP funkciót a hippocampus CA1-es régiójában, még a kezeletlen csoporthoz képest is. Ezeknél az állatoknál még a HFS-t követő néhány percre jellemző poszt-tetanikus potencírozódás (PTP) jelensége sem volt megfigyelhető. A 24 órával a 2VO-t követően kainsavas utókezelésben részesült csoportban (2VO 24h KA) is mindössze 20-25%-os amplitúdó-növekedést figyelhetünk meg, amely azonban csak az első 10-15 perces szakaszban maradt meg az indukciót követően. Ezután a fEPSP-k amplitúdói fokozatosan csökkenni kezdtek, és a közvetlen 2VO-t követően KA kezelt csoporthoz hasonlóan a kísérletek végére visszaestek a HFS előtt mért kiindulási szintre. A kainsavas poszt kondicionálás 48 órával a 30 percig tartó hipoperfúziót követően (2VO 48h KA) meglepően jó eredményt hozott az előző, korai KA kezelést kapott csoportokhoz képest. Az LTP indukciót követően a fEPSP-k amplitúdó értékei 35-40%-os növekedést mutattak, amely megközelíti az ábrán szaggatott vonallal jelölt, kontroll csoportra jellemző eredményeket. A megemelkedett mezőpotenciálok értékei stabilan fennmaradtak a kísérletek végéig, amely összevethető az intakt, egészséges állatok korai LTP-re jellemző tulajdonságaival (21. ábra

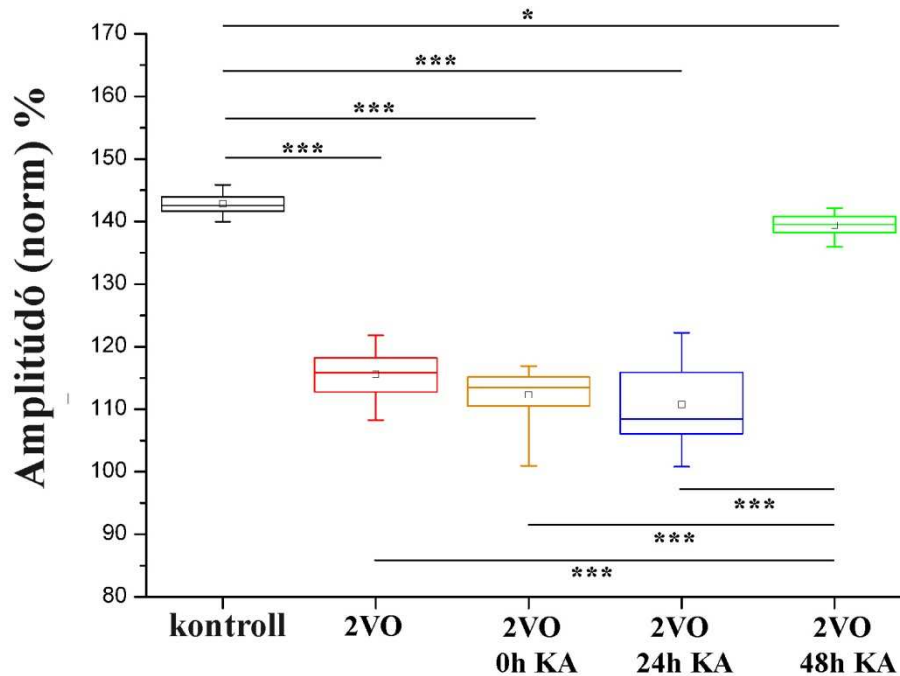
B). Az LTP indukálhatóságra vonatkozó méréseink minden vizsgált csoportban a 2VO-t követő 3. napon történtek.



21. ábra A Schaffer-kollaterálisok magas frekvenciás ingerlésével (HFS: 500 impulzus, 100Hz) kiváltott LTP alakulása a hippocampus CA1-es régiójában a különböző csoportokban (normalizált átlagok \pm S.E.M.). Az ábrák felső részén a kísérletes beavatkozások és vizsgálatok időbeli elhelyezkedésének sematikus ábrázolása látható. **A:** Az álműtött kontroll csoportban (kontroll) a HFS-t követően a fEPSPk amplitúdó értékei hozzávetőlegesen 45%-al nőttek meg, és egyenletesen megmaradtak a kísérletek végéig. A 2VO-s csoportban (2VO) az LTP indukciót követően jóval kisebb mértékű és kevésbé stabil amplitúdó növekedést tapasztaltunk. **B:** A kainsavval (KA) történő posztkondicionálás kivédi a 2VO-t követő LTP funkciók károsodását, de a védőhatás nagyan függ az alkalmazás időpontjától. Hasonlóan a 2VO-s állatokhoz a korán posztkondicionált csoportokban (2VO 0h KA és 2VO 24h KA) nem lehetett stabil LTP-t kiváltani. 30 perces hipoperfúzió után a 48 órával KA kezelt csoportban (2VO 48h KA) az LTP indukálhatósága megközelítette a kontroll értékeket, amelyet az ábrán szagatott vonallal jelöltünk.

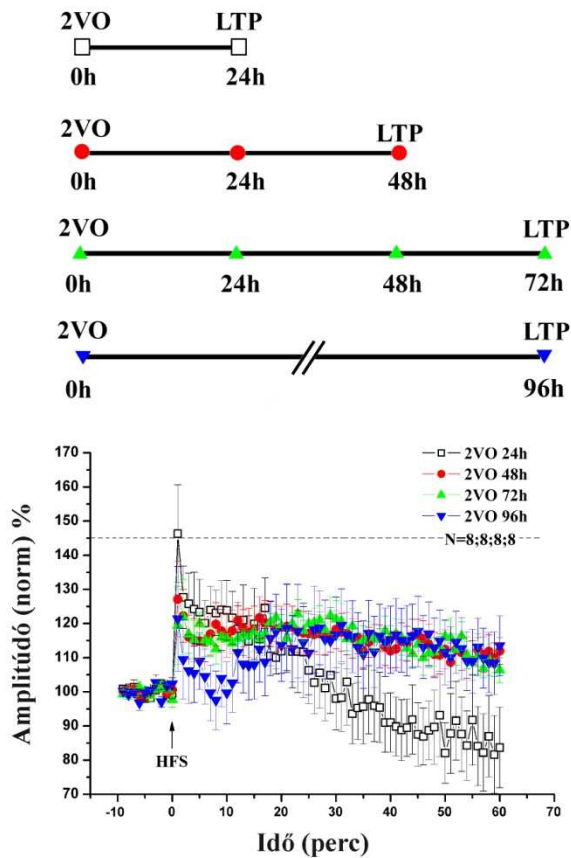
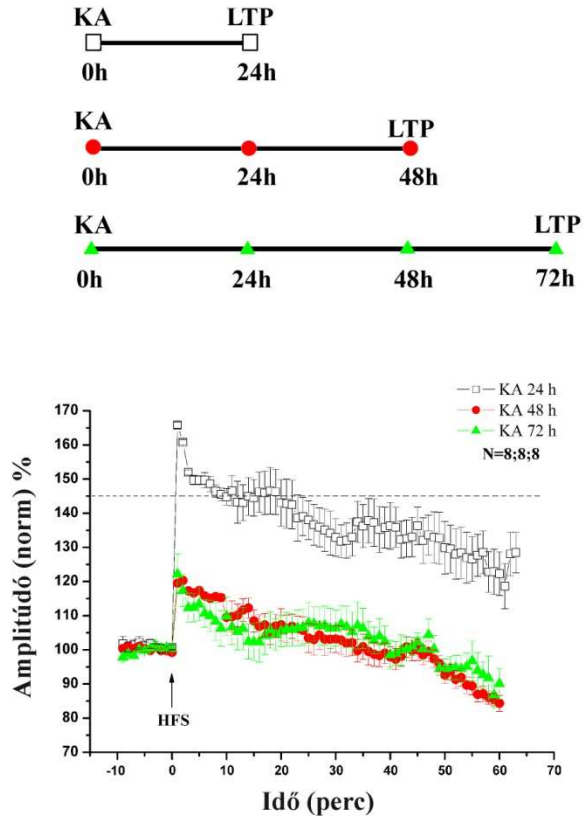
A 21. ábra A és B részében bemutatott elektrofiziológiai eredmények összegzéséhez és a statisztikailag szignifikáns különbségek bemutatásához a fEPSP-k amplitúdóból box-plot diagramot készítettünk a HFS-t követő 60 perces regisztrációs periódusra vonatkozóan (22. ábra). Az ábrán található négyzetek az egyes csoportokban regisztrált amplitúdó értékek mediánját, a bennük található vízszintes vonalak pedig az átlagértéküket jelölik. A statisztikai

analízishez a nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. A csoportok között jelentkező szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük.



22. ábra A regisztrált fEPSP-k alakulása a különböző csoportokban a HFS-t követő 60 perces periódusra vonatkozóan. A 30 percig tartó globális hipoperfúzió (2VO) 3 nappal az ischaemiát követően jelentősen rontotta a szinaptikus plaszticitást, hiszen a HFS-t követően a fEPSP-k amplitúdói mindössze 15%-os növekedést mutattak az álműtött kontroll állatoknál tapasztalt 42-45%-os emelkedéshez képest (kontroll). A 2VO-t követő korai KA kezelések: közvetlenül az ischaemia után (2VO 0h KA) és 1 nappal később (2VO 24h KA) még inkább rontották az LTP indukálhatóságát. Ezeknél a csoportoknál csak maximum 8-12%-os amplitúdó növekedést tapasztaltunk. Amennyiben a kainsavval történő posztkondicionálás 48 órával az ischaemiás inzultus után történt, a regisztrált értékek megközelítették a kontroll csoport eredményeit (2VO 48h KA). * szignifikáns különbség a csoportok között. *: $P \leq 0,05$; ***: $P \leq 0,001$.

Egy szisztematikus mérésorozatot végeztünk a 2VO-n átesett állatokon hogy megvizsgáljuk azt, hogy az ischaemiás inzultus következtében leromlott szinaptikus plaszticitásban esetleg idővel bekövetkezik-e spontán javulás. Ezekben a kísérletekben a 30 percig tartó hipoperfúziót követően különböző túlélési idő után végeztünk az LTP kiválthatóságára vonatkozó *in vitro* méréseket napról-napra (23. ábra A). Az állatokat az egytől (2VO 24h) 4 napig (2VO 96h) terjedő túlélési intervallumban vizsgáltuk meg. Általánosságban elmondható az, hogy a 2VO-t szenvedett állatokban nem sikerült stabil, kontroll értékeket (szaggatott vonal) megközelítő LTP-t kiváltani egyik általunk vizsgált időpontban sem.

A**B**

23. ábra A Schaffer-kollaterálisok magas frekvenciás ingerlésével (HFS: 500 impulzus, 100Hz) kiváltott LTP alakulása a hippocampus CA1-es régiójában a különböző csoportokban (normalizált átlagok \pm S.E.M.). Az ábrák felső részén a kísérletes beavatkozások és vizsgálatok időbeli elhelyezkedésének sematikus ábrázolása látható. **A:** A 30 percig tartó globális hipoperfúzió (2VO) következményei az LTP kiválthatóságára a különböző túlélési idejű csoportokban. A legrosszabb eredményeket az 1 napos túlélésű csoportban (2VO 24h) tapasztaltuk, de a 2 (2VO 48h), 3 (2VO 72h) és 4 napos (2VO 96h) túlélésű állatok amplitúdó értékei sem közelítették meg az átlagos kontroll szintet (szaggatott vonal). **B:** Az önmagában alkalmazott kainsavas kezelés (KA) következményei az LTP kiválthatóságára a különböző túlélési idejű csoportokban. A KA kezelést követő első napon (KA 24h) a HFS után egy robusztus PTP-t figyelhetünk meg, azonban a fEPSP-k amplitúdói csökkenni kezdenek, és az 1 órás regisztrációs periódus végére a kontroll értékek (szaggatott vonal) alá esnek vissza. A KA kezelés után 2 (KA 48h) illetve 3 nappal (KA 72h) egyáltalán nem sikerült LTP-t indukálnunk.

A legrosszabb eredményeket a 2VO utáni 1 napos túlélésű (2VO 24h) csoportban tapasztaltuk. Ezekben az állatokban a HFS-t követően ugyan megjelenik némi poszt-tetanikus potencírozódás (PTP), azonban a megnövekedett amplitúdók jelentősen csökkenni kezdenek és az indukciót követő 30. percen visszatérnek a HFS előtti szintre. A kísérletek végére a fEPSP-k amplitúdói jóval a kiindulási értékek alá csökkennek, amelynek okai tisztázatlanok.

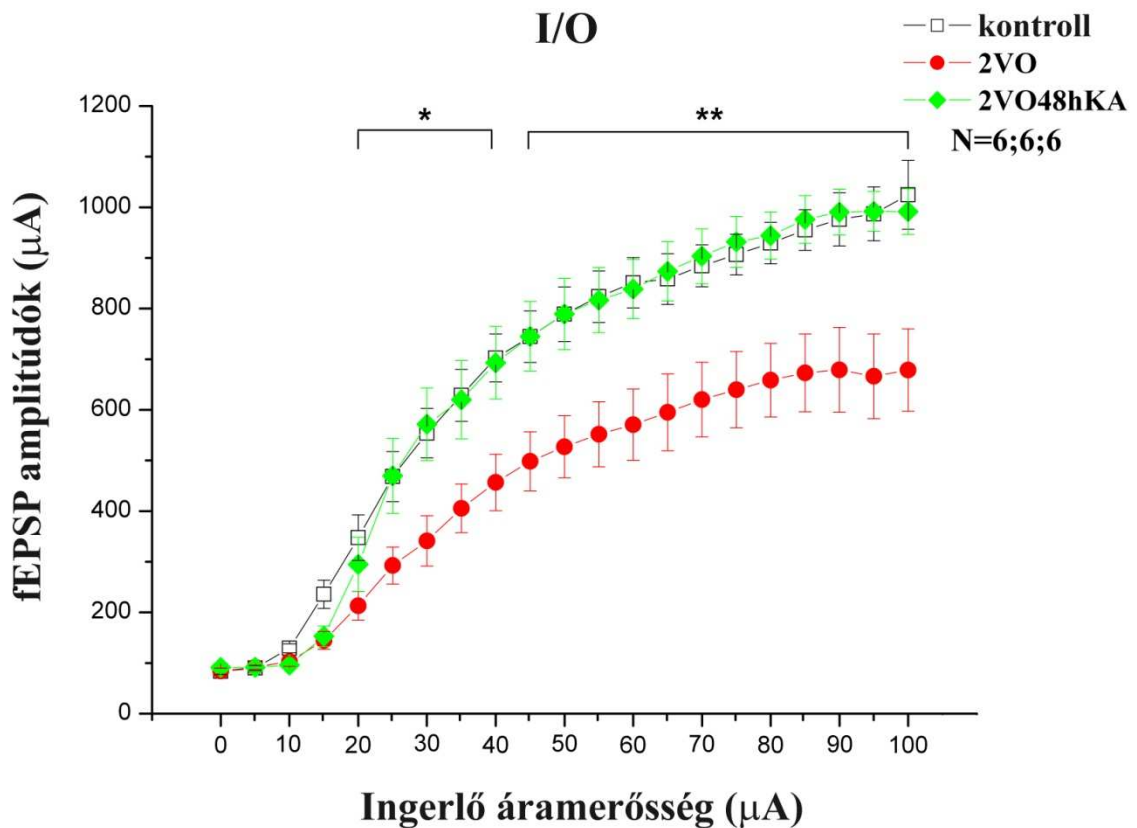
A 2VO után 2 (2VO 48h), 3 (2VO 72h) és 4 napos túlélésű (2VO 96h) állatok amplitúdói a HFS-t követően nem mutatnak jelentős különbségeket, ugyanakkor egyik csoport sem közelíti meg a kontroll értékeket. A 2VO után 3 napos túlélésű állatok LTP kiválthatóságára vonatkozó eredményeit korábban a 21. ábra A részében már bemutattuk, de a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért ezen részben is feltüntettük.

Az önmagában történő kainsav kezelés (5 mg/ttkg) időbeli hatásait a szinaptikus plaszticitásra egy az előzőekhez hasonló, szisztematikus mérésorozattal vizsgáltuk meg. Az LTP indukálhatóságát ezekben a kísérletekben a KA kezelést követően 1 (KA 24h), 2 (KA 48h) illetve 3 nappal (KA 72) mértük meg az állatok hippocampusának CA1-es régiójában (23. ábra B). 24 órával a KA kezelést követően a Shaffer-kollaterálisok magas frekvenciás ingerlése után, egy markáns PTP tapasztaltunk. A megnövekedett amplitúdók azonban nem maradtak stabilak, folyamatosan csökkenni kezdtek, és a kísérletek végére az ábrán szaggatott vonallal jelzett átlagos kontroll értékek alá süllyedtek, amely a szinaptikus plaszticitás zavaraira utal. A KA kezelés után 2 (KA 48h) illetve 3 napos túlélésű (KA 72h) csoportokban a HFS-t követően csak egy nagyon csekély mértékű PTP figyelhető meg. A fEPSP-k amplitúdói azonban mindkét csoportban jelentős csökkenésbe kezdenek, és az indukciót követő 30. percben elérik a HFS előtti kiinduló értékeket, majd tovább csökkenve a kísérletek végére azok alá süllyednek. Az utóbbi 2 csoportról elmondható tehát, hogy egyáltalán nem sikerült LTP-t indukálnunk a hippocampus CA1-es régiójában.

Az alapvető szinaptikus jeltovábbítás vizsgálata:

Megvizsgáltuk azt, hogy a 30 percig tartó globális hipoperfúzió milyen mértékben befolyásolja az alapvető szinaptikus jeltovábbítás folyamatait a CA1-es régióban. Ezáltal kiderül az, hogy az előző alfejezetben bemutatott szinaptikus plaszticitás-csökkenésben szerepet játszik-e a Shaffer-kollaterálisok és a CA1-es régió piramissejtjei között található szinapszisok megváltozott transzmissziója. Ezen vizsgálatokat input/output görbék felvételével végeztük el az álműtött kontroll (kontroll), a 2VO-n átesett kezeletlen (2VO) és a 2VO után 2 nappal KA kezelt (2VO 48h KA) csoportokban (24. ábra). Minden csoportban a beavatkozás után 3 napos túlélést követően hajtottuk végre a kísérleteket. A fEPSP-k amplitúdóinak változásait a különböző áramerősségű ingerlő impulzusok függvényében ábrázoltuk a 0-100 μ A közötti intervallumban 5 μ A-es lépésekben. Az ábrán jól látszik az, hogy a 2VO-s csoport állataiból regisztrált I/O görbe egyértelműen és statisztikailag szignifikánsan elválik a kontroll görbétől, azaz a tranziens hipoperfúziós inzultus jelentősen

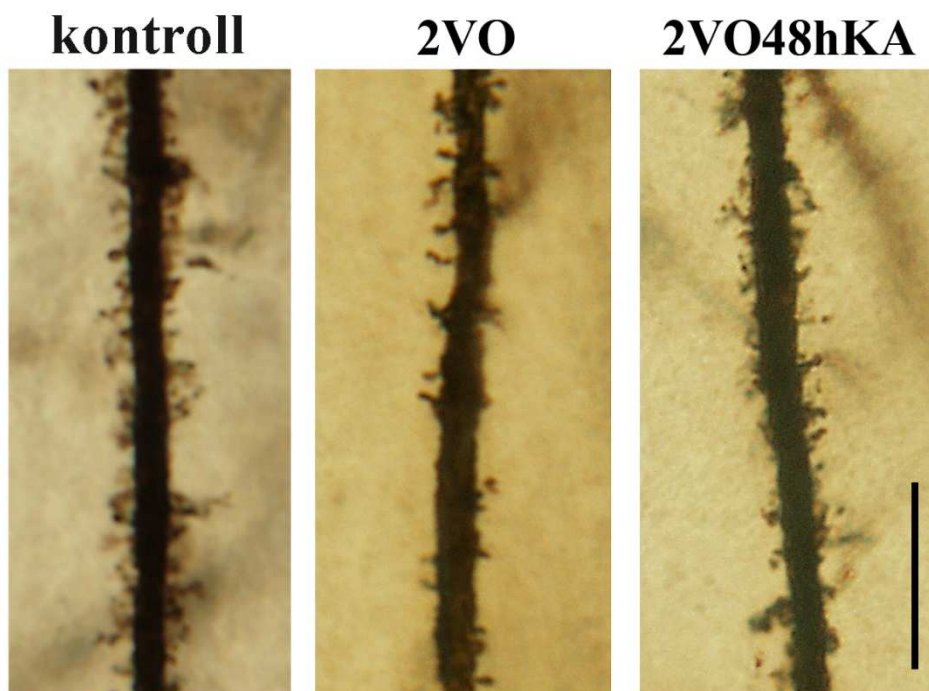
rontotta a szinaptikus jeltovábbítás hatékonyságát a vizsgált agyi területen. A KA kezelés 2 nappal a hipoperfúziót követően alkalmazva kivédte a szinaptikus jeltovábbításban bekövetkező károsodásokat, mivel a 2VO 48h KA csoport állataiból regisztrált I/O görbék nem tértek el szignifikánsan a kontroll görbétől.



24. ábra A szinaptikus jeltovábbítás hatékonyságának vizsgálata I/O görbék felvételével az álműtött kontroll (kontroll), a 2VO-s kezeletlen (2VO) és 2VO után 2 nappal KA-tal posztkondicionált csoportokban (2VO 48h KA). A tranziens hipoperfúzió szignifikánsan rontotta a szinaptikus transzmissziós folyamatokat, amely azonban az inzultust követő 2. napon, KA posztkondicionálással teljesen kivédhető volt. Átlagok \pm S.E.M. * szignifikáns különbség a kontroll és 2VO-s csoport között. *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,001$.

Morfológia:

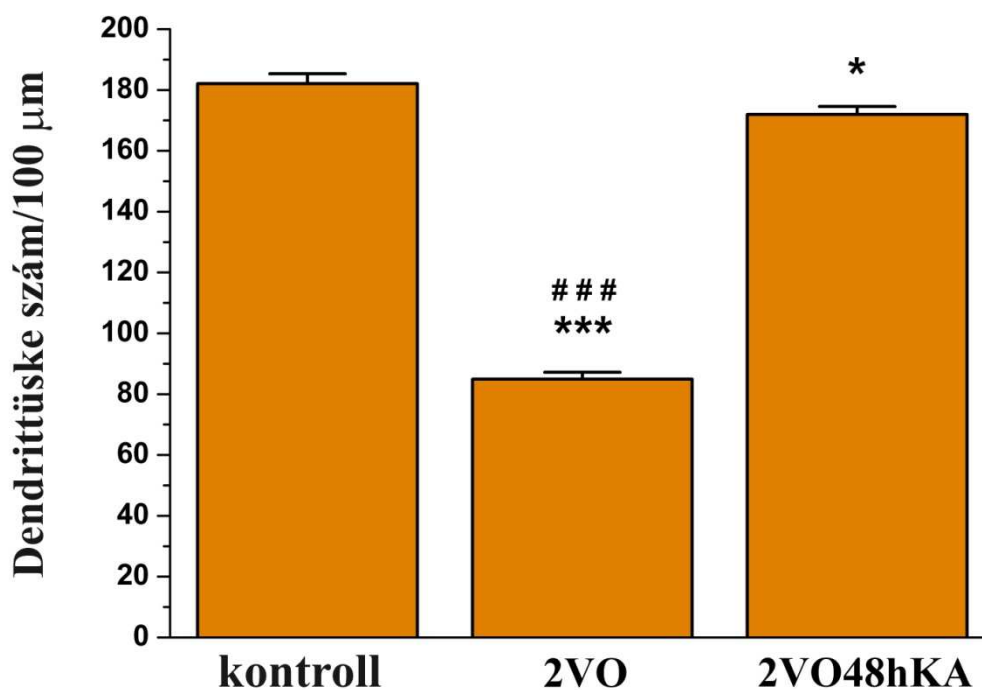
A dendrittüskék a szöveti mikrokörnyezet változásaira és számos kóreltani hatásra rendkívül érzékenyen és gyorsan reagálnak. Ischaemiás állapotban kialakuló oxigén- és tápanyaghiány következtében például számuk drámaian lecsökkenhet. A Golgi-Cox festési eljárás nagy részletességgel jeleníti meg a neuronok dendritikus arborizációját, beleértve a dendrittüskéket is. A jelölődött piramisisejtek számában nem, azonban a dendrittüskék denzitásában jelentős különbség adódott az általunk vizsgált csoportokban a hippocampus CA1-es régióban (25., 26. ábra).



25. ábra Reprezentatív fotók a Golgi-Cox festéssel megjelenített dendrittüskék számának változásáról a 3 különböző kísérleti állatcsoportban az általunk vizsgált CA1-es piramisisejtek apikális dendritikus régiójában. A legnagyobb számban az álműtött kontroll (kontroll) csoportban találjuk a dendrittüskéket. A 30 perces globális hipoperfúzió (2VO) drasztikusan lecsökkentette a dendrittüskék sűrűségét, amelyet az inzultust követő 2. napon kainsavas poszt kondicionálással (2VO48hKA) jelentősen mérsékelni lehet. Skála: 20 μ m.

Az álműtött kontroll (kontroll) csoportban átlagosan 182,07 db/100 μ m dendrittüskét detektáltunk a CA1-es piramisisejtek apikális dendritjeinek meghatározott szakaszain. Ezek az eredmények összhangban állnak más kutatócsoportok által kapott eredményekkel (Gonzalez-Burgos és mtsai., 2007). A 30 perces globális hipoperfúziót követően 3 nappal (2VO) a dendrittüskék száma drasztikusan lecsökkent (átlag: 84,95 db/100 μ m) a kezeletlen

csoporthoz képest, ugyanakkor a kóros állapotokban gyakorta előforduló dendritduzzadást nem tapasztaltunk. A 2VO után kainsavval poszt kondicionált állatokban (2VO 48h KA) a dendrittüskék száma a statisztikai analízis alapján szignifikánsan jobb eredményeket mutatott és megközelítette a kontroll értékeket (átlag:171,96 db/100 μ m; 26. ábra). A poszt kondicionálást a korábbi *in vitro* elektrofiziológiai eredmények alapján minden esetben 2 nappal az ischaemiás inzultus után végeztük a túlélési idő pedig mindhárom csoportban 3 nap volt. Ezek a morfológiai eredmények szoros összefüggést mutatnak, és megerősítik az elektrofiziológiai méréseinket.



26. ábra Oszlopdiaagram a dendrittüskék sűrűségének változásáról az általunk vizsgált csoportokban. Már a tranzien, átmeneti globális hipoperfúzió (2VO) is jelentősen lecsökkentette a dendrittüskék számát a CA1-es piramis sejtek apikális dendritjeinek általunk vizsgált régiójában az intakt (kontroll) állatokéhoz képest. A kainsavas poszt kondicionálás 2 nappal az ischaemiás inzultus után alkalmazva közel a kontroll értékekre állította vissza a dendrittüskék sűrűségét. Minden csoportban 3-3 állatból, állatonként 20-20 dendritszakaszt számolt meg „vakon” 3 független kísérletező. Átlag \pm S.E.M., kontroll: $182,07 \pm 3,25$; 2VO: $84,95 \pm 2,23$; 2VO48hKA: $171,96 \pm 2,58$. * szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest. # szignifikáns különbség a 2VO és a 2VO48hKA csoport között. *,#: $P \leq 0,05$; ***,###: $P \leq 0,001$.

Diszkusszió

Az agyban leggyakrabban ischaemiás vagy hypoxiás károsodás alakul ki, amely a véráramlás zavarával, az idegsejtek károsodásával, pusztulásával jár és a 3. vezető halálok az iparilag fejlett országokban (WHO, 2009). A központi idegrendszer fiziológias működéséhez folyamatos ellátást igényel a fő szubsztrátokból (oxigén, glükóz, ATP). Amennyiben a vérellátás hiánya hosszú távon fennmarad, energiazavar alakul ki a neuronokban (Pulsinelli és mtsai., 1982; Beck és mtsai., 1995; Derdeyn és mtsai., 1999). Az ATP-hiány következtében a plazmamembránokban található energiaigényes ionpumpák működése zavart szenved, ezáltal felborul a sejtek ion-homeosztázisa és a beáramló Na^+ ionok hatására depolarizálódnak (Leigh és Meldrum, 1996). Ennek köszönhetően a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák is aktiválódnak, ami által megnő a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja. A fokozott Ca^{2+} -beáramlás miatt a serkentő Glu felszabadulása fokozódik az axonterminálisokban, ami a sejtek glutamát receptorainak aktivációja útján újabb direkt és indirekt Ca^{2+} beáramlást okoz. Ezen felül két intracelluláris Ca^{2+} -raktár is kinyílik: az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium (White és mtsai., 2000). A Glu visszavétele a sejtekbe a Na^+ -függő EAAT-eken keresztül szintén zavart szenved (Vesce és mtsai., 2007). A fokozott Glu felszabadulás hatására excitotoxicitás alakul ki, megváltozik a környező sejtek működése, és ezzel az ischaemiás esemény hatásai szöveti szintre emelkednek (White és mtsai., 2000). Az említett folyamatok kimozdítják az érintett területen található idegsejteket az anti- és proapoptotikus egyensúlyból, és elindul a programozott sejthalál folyamata. Amennyiben a hypoxiát követően az ATP-hiány átlép egy kritikus értéket, akkor már nem apoptózis, hanem nekrosis következik be (Nicotera és mtsai., 2000).

A legtöbb neuroprotektív stratégia a fent említett folyamatok megfékezését célozza. Az ischaemiás események hatására kialakuló változások számos neuroprotektív támadáspontot rejtenek. Az ischaemiás neuronpusztulás patomechanizmusának egyre alaposabb ismerete megnövelte a lehetséges neuroprotektív irányuló terápiás próbálkozások számát (Lyden és Wahlgren, 2000; White és mtsai., 2000). Ennek ellenére, ha összevetjük az ischaemiás stroke állatmodelljeit a humán kórfolyamatokkal, kiderül az, hogy a kísérletes eredmények emberi megbetegedésre vonatkoztatása számos buktatót rejt (Hoyte és mtsai., 2004). A humán vizsgálatok sikertelenségének főbb okai lehetnek: 1. az egyes szerek állatkísérletekben vizsgált neuroprotektív hatását gyakran a szubletálisan károsodott agyterület (penumbra) „visszatérése”, az infarktus kiterjedésének csökkenése igazolta, de a

neurológiai funkció értékelése elmaradt; 2. a beteg életminőségét döntően meghatározó intellektus és a magasabb kérgi funkciók vizsgálata állatkísérletekben nem, vagy csak nagyon áttételesen lehetséges; 3. a klinikai kipróbálásban gyakran heterogén és kis létszámú a betegpopuláció, nem optimális a vizsgálati protokoll, valamint a szubakut és a krónikus fázis elemzése és farmakoterápiája háttérbe szorul (Zador és mtsai., 2004). Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy a több támadásponton ható gyógyszer-kombinációk (terápiás koktélok) alkalmazása, valamint az agyi plaszticitást serkentő beavatkozások adhatnak kedvező eredményt. Ezek fényében szükség van újabb és újabb neuroprotektív stratégiák és farmakonok tesztelésére, amelyek később talán sikeresen használhatóak lesznek a humán gyógyászatban is.

Az ischaemiás inzultust követően kialakuló patológiás folyamatok pontos időbeli behatárolása nagyon fontos a hatásos terápia megtervezésében. Az infarktus környékén kialakuló depolarizáció, a Ca^{2+} intracelluláris felhalmozódása, a glutamát excitotoxicitás, és az oxigén szabadgyökök keletkezése (korai károsodások) az ischaemiás periódus után már nagyon rövid időn belül bekövetkeznek. A folyamatokkal párhuzamosan a SEP-ok amplitúdói is jelentősen lecsökkennek (Minamide és mtsai., 1994). A károsodott szövet sejteinek apoptózisa és az ezzel egyidőben kialakuló gyulladási folyamatok (késői károsodások) megindulása órákkal az ischaemiás periódus után kezdődik meg, és lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat (Dirnagl és mtsai., 2003).

Közel fél évszázada tudjuk azt, hogy a Glu az agyból a vérbe szállítható (Berl és mtsai., 1961), azonban a folyamat jelentőségéről és a benne rejlő neuroprotektív beavatkozás lehetőségéről, csak az utóbbi években jelentek meg közlemények. Patológiás körülmények között a koordinálatlanul felszabaduló Glu okozza az excitotoxicitást, amely a kiterjedt neuron-károsodást és a neuronpusztulást okozza. Az agy érhálózata igen kifejezett, az átlagos távolság 2 kapilláris között mindössze 10-20 μm , így ha kis túlzással is, de az agyban majdnem minden neuron rendelkezik saját kapillárisal (Bickel és mtsai., 2001). Ráadásul az agyi kapilláris hálózat nagyon gazdag EAAT-ben, mind az érfalon, mind az azt körülvevő asztrocita végtalpakon is számos transzportert találunk (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995). Ezek EAAT-ek így fontos szerepet játszhatnak az extracelluláris térben kórosan megemelkedett Glu eltávolításában az agyból a vérbe történő Glu efflux révén (Vesce és mtsai., 2007).

A fototrombotikus úton előidézett ischaemiás inzultust követően egymást követő kérgi kúszó-depressziós folyamatok jelentkeznek, amelyeket az extracelluláris Glu koncentráció

masszív megemelkedése kísér, és legalább 5 órán keresztül fennmarad (Scheller és mtsai., 2000). Mivel a fokális ischaemia után kialakuló infarktus kiterjedését különböző NMDA receptor antagonisták használatával sikerült jelentősen csökkenteni (Kharlamov és mtsai., 1996; Bordi és mtsai., 1997; Umemura és mtsai., 1997; Stieg és mtsai., 1999), egyértelművé vált a Glu fontos szerepe az ischaemiát követő patológiás folyamatokban. Az intravénásan a vérkeringésbe juttatott OxAc a vérben található Glu ko-szubsztrátjaként a GOT enzim által katalizált folyamatban 2- α -ketoglutaráttá és aszpartáttá alakul. Ennek köszönhetően a Glu koncentrációja a vérplazmában jelentősen lecsökken, ezáltal felgyorsulhat az agyból a vérbe történő Glu efflux sebessége (Gottlieb és mtsai., 2003). Ezen túlmenően az utóbbi években megjelent közlemények beszámolnak az OxAc utókezelés neuroprotektív hatásáról traumás, zárt feji sérülés esetében (Zlotnik és mtsai., 2007) valamint globális hipoperfúziós modellben (Marosi és mtsai., 2009) egyaránt.

Munkacsoportunkban azt vártuk, hogy a fototrombotikus lézió hatására a SEP-ok amplitúdói lecsökkennek majd az érintett területen, ahogyan azt korábban számos alkalommal az ischaemia korai következményeként tapasztalták (Ladds és mtsai., 1988; Baik és mtsai., 1990; Liu és mtsai., 1992). Továbbá az irodalmi adatok alapján feltételeztük azt is, hogy az OxAc kezelés hatására sikerül visszaszorítani a kialakuló infarktus kiterjedését, és a fent említett funkcionális károsodást jelző amplitúdó csökkenés is mérsékelhető lesz. Kísérleteink eredményei összhangban állnak a feltételezéseinkkel. A fototrombotikus lézió azonnal bekövetkező, nagy fokú (70-75%-os) amplitudó-csökkenést okozott az érintett agyterületen. Ezt a jelentős funkcionális károsodást OxAc kezeléssel szignifikánsan csökkenteni lehetett mind a core, mind a penumbra régióban. A fototrombotikus úton előidézett fokális ischaemia ugyanakkor több milliméter kiterjedésű léziót és jelentős idegsejt pusztulást is okozott. Az i.v. OxAc kezelés azonban az infarktus méretét és az elhalt neuronok számát is jelentősen (~30%-al) visszaszorította.

Az OxAc kezelés alkalmazásának időablaka azonban a patkány esetében meglehetősen szűk: nem telhet el két óránál több a trauma és a kezelés között (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007). Ez egybevág azzal az időtartammal, amely idő alatt a vérben a Glu koncentráció jelentősen megnő az ischaemiás stroke-ot, vagy a traumás agyi sérülést követően (Faden és mtsai., 1989; Guyot és mtsai., 2001). A humán terápiás ablak ennél jelentősen tágabb, mivel a megemelkedett Glu-szint a stroke-ot, vagy traumás agyi sérülést követően órákkal, sőt napokkal később is megfigyelhető (Baker és mtsai., 1993; Bullock és mtsai., 1998; Vespa és mtsai., 1998).

Az OxAc szerepe nem merül ki a vér közvetítette Glu-eltávolítás elősegítésében, hiszen az agyon belül is kifejtheti jótékony hatásait. Képes fokozni a mitokondriális energiatermelő folyamatokat a NAD-függő malát-aszpartát átalakulás gyorsításával, továbbá a többi ketosavhoz hasonlóan képes csökkenteni az ischaemiás/reperfúziós sérülésben kulcsszerepet játszó hidrogén-peroxid képződést is (Traystman és mtsai., 1991; Desagher és mtsai., 1997). Ezen is túl kiderült az, hogy az OxAc közreműködhet a kinurenin kinurénsavvá történő átalakulásában, amely folyamat transzaminálás révén megy keresztül (Stone, 1993; Hodgkins és mtsai., 1999). A kinurénsav egy endogen kompetitív ionotróp Glu receptor antagonistá révén pedig szintén neuroprotektív szerepet tölthet be az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kóros megemelkedésének gátlásával.

Mivel az OxAc ilyen szerteágazó szerepet tölt be a szervezetben, további vizsgálatokat igényel annak a kiderítése, hogy az általunk tapasztalt neuroprotektív hatásokat vajon a vér közvetítette Glu-eltávolítás elősegítése, vagy az utóbb említett folyamatok révén fejti-e ki. Összegzésként a funkcionális és szövettani vizsgálataink alapján elmondható, hogy az OxAc i.v. alkalmazása mérsékelte a fototrombotikus lézióval előidézett fokális ischaemia káros hatásait az érintett agykérgi területen. Ez a védőhatás már 4 órával a beavatkozás után megmutatkozik, amely összhangban áll a Zlotnik és mtsai. által leírt eredményekkel, amelyben az OxAc és a piruvát neuroprotektív hatásai szintén az első néhány órán belül jelentkeztek (Zlotnik és mtsai., 2007; Zlotnik és mtsai., 2008).

Az OxAc alkalmazása számos előnnyel bír a „klasszikus” neuroprotektív szerekkel szemben: 1. az OxAc kezelés nem receptor moduláción keresztül fejti ki hatását, ezért nem akadályozza azon fiziológiás eseményeket, amelyek az agysérülés utáni neurorepair folyamatában végbemennének, és amelyekben a Glu-nak, mint neurotranszmitternek, valamint receptorainak jelentős szerepe van (Biegon és mtsai., 2004). 2. A folyamat önszabályozó, ha az agy és a vér közötti Glu koncentráció különbség kiegyenlítődik, megszűnik a kapillárisok falában lévő fokozott EAAT aktiváció is. 3. Az OxAc endogén vegyület szemben számos eddig kipróbált neuroprotektívnek vélt hatóanyaggal szemben (pl.: MK-801), ezért alkalmazása sokkal biztonságosabb lehet. 4. Az elméleti megfontolásokból és a kísérleti eredményeinkből is következik, hogy a kezelést elég egyszer alkalmazni rövid idővel az ischaemiás inzultust követően. Az előzőek fényében az OxAc a jövőben remélhetőleg az ischaemiás események utáni neuroprotektív terápia része lehet a humán gyógyászatban is.

A disszertáció második felében bemutatott kísérletsorozatunkban egy viszonylag új és kevésbé ismert neuroprotektív stratégiát, a posztkondicionálást teszteltük globális hipoperfúziós modellben. Nagy számú kísérleti adat támasztja alá azt a feltételezést, miszerint az LTP és memória sejtszintű folyamataiban kulcsszerepet játszik a tüskeszinapszisok átrendeződése és stabilizálódása (Kasai és mtsai., 2003; Kandel, 2004). A piramisneuronok a serkentő, glutamáterg bemeneteit, szinte kizárólag a tüskeszinapszisokon keresztül kapják (Fiala és mtsai., 2002), ezért a dendrittüskék számának változása a kóros folyamatokban jelentősen befolyásolja a neuronok serkentő folyamatait és válaszadó képességét. Az LTP kialakulása során a dendrittüskék morfológiája alaposan megváltozik (Lang és mtsai., 2004; Matsuzaki és mtsai., 2004). Az alakbeli változások következtében a posztszinaptikus potenciálok vezetése (Araya és mtsai., 2006) és a jelátvivő anyagok eloszlása is megváltozik a dendrittüskék és a szinaptikus rések között (Hugel és mtsai., 2009). Patológiai körülmények között, mint az ischaemiás agyban is, a hosszabb dendrittüskék képesek a hálózat szintjén a neuronokat biokémiai és elektromosan izolálni a lokális excitotoxikus hatásoktól, így megakadályozhatják az apoptotikus folyamatok elindulását (Brown és mtsai., 2008). A folyamat úgy történik, hogy a spine-okban található tüskeapparátus képes az excitotoxicitás folyamataiban megemelkedő Ca^{2+} szintet pufferelni (Yuste és Denk, 1995; Majewska és mtsai., 2000). A poszt-ischaemiás agyban a korai válaszként jelentkező dendritikus plaszticitás képes megvédeni a neuronokat a patológiai folyamatoktól, mint például az excitotoxicitás, a fokozott Ca^{2+} ion beáramlás a neuronokba (Bano és Nicotera, 2007) vagy a spontán kialakuló, kúszó depolarizáció (Risher és mtsai., 2010). A 2VO-val előidézett globális előagyhi hipoperfúzió (nem teljes ischaemia) nem okoz klasszikus hisztológiai módszerekkel kimutatható neuronpusztulást még az ischaemiás/hipoxiás állapotokra leginkább érzékeny agyterületeken sem (Marosi és mtsai., 2009). Azonban a dendrittüskeszám-csökkenése és az egyéb a dendritikus plaszticitásban bekövetkező változások már önmagukban felelősek lehetnek az LTP kiválthatóságának jelentős romlásáért a hippocampális CA1-es régióban.

A kainát típusú ionotróp Glu receptorok (KARs) szintén döntő szerepet játszanak az idegrendszeri plaszticitás és a glutamáterg szinaptikus transzmissziós folyamatokban egyaránt (Bortolotto és mtsai., 1999). A KARs kiemelt szerepet játszanak a szinaptikus fejlődésben (Tashiro és mtsai., 2003; Marchal és Mulle, 2004), képesek szabályozni a filopódiumok mozgását a hippocampus moha rostjain (Tashiro és mtsai., 2003), amely a szinapszisok kialakulásának egy korai lépése. A szinapszisok éréséhez és a pre- és posztszinaptikus folyamatok megerősítéséhez szükség van a GluR5 és GluR6 alegységet tartalmazó KARs-ra a

CA3-as régióban (Marchal és Mulle, 2004). A KARs-at tartalmazó CA1-es interneuronok egy ionotróp folyamat révén depolarizálják a sejttestet (Cossart és mtsai., 1998; Rodriguez-Moreno és mtsai., 2000), amíg a KARs másik populációja G-fehérjéhez kapcsolt mechanizmussal csökkenti a kiváltott IPSC-k amplitúdóját és a GABA felszabadulást (Clarke és mtsai., 1997; Mulle és mtsai., 2000; Rodriguez-Moreno és mtsai., 2000; Christensen és mtsai., 2004). A CA1-es régióban a GluR5 alegységet tartalmazó KARs farmakológiai aktivációja jelentősen visszaveti a glutamaterg jelátvitel intenzitását (Vignes és mtsai., 1998; Clarke és Collingridge, 2002) a preszinaptikus receptorok G-fehérje függő aktivációja által (Frerking és mtsai., 2001; Lauri és mtsai., 2006). Ugyanakkor a GluR5 alegység huzamosabb ideig tartó aktivációja a PKC aktiváció révén specifikusan és tartósan megnöveli a glutamaterg szinapszisok számát a CA1-es régióban (Vesikansa és mtsai., 2007). Feltehetően a CA3-as és CA1-es régióban is ugyanazon a KAR-függő módon és a G-fehérjéhez kötött szignalizációs folyamatok közreműködésével stabilizálódnak a szinapszisok. Egyúttal fontos megemlíteni azt is, hogy ezen receptorok endogén aktivációja csak a fejlődő, fiatal állatok idegrendszerében zajlik le, de a felnőtt, érett hippocampusban azonban már nem (Lauri és mtsai., 2006).

A kainsav (KA) serkentő és neurotoxikus anyag is egyben (Olney és mtsai., 1974), amely alkalmazása lokálisan vagy szisztémásan, kiterjedt neurodegenerációt okoz az agyban, legfőképpen a hippocampus területén (Sperk és mtsai., 1985). A folyamatot a CA3-as, a CA1-es és a Hylus környékén is jelentős sejtpusztulás kísérheti (Nadler és mtsai., 1978; Sperrk és mtsai., 1983). Ezzel egy időben a KA kezelés neurogenézist indukál a gyrus dentatus területén (Gray és Sundstrom, 1998; Jaako és mtsai., 2009) abnormális szinaptikus kapcsolatokat és neuronális hálózatokat kialakítva, amelyek befolyásolják a hippocampális funkciókat (Scharfman és mtsai., 2000). A magas dózisban alkalmazott KA status epilepticus-t okoz, visszatérő rohamokkal és a térbeli memória és tanulási folyamatok jelentős romlásával (Mikati és mtsai., 1994; Sutula és mtsai., 1995). A konvulziót kiváltó dózis a proto-onkoproteinek, úgy mint a Fra, c-Fos és Jun fehérjék expresszióját is indukálja (Mikati és mtsai., 1994; Sutula és mtsai., 1995). A lokális génkifejeződésben bekövetkező változások kapcsolatban állnak a KA által indukált rohamokat követően jelentkező hippocampális neuronok pusztulásával és túlélésével (Xia és mtsai., 1995). Ezen túl a KA aktiválja a mitogén-aktivált kinázokat (MAPKs) is. Ezek közül a c-Jun N terminális kináz (JNK) nemcsak számos apoptózissal összefüggő fehérjét (c-Jun, p53, Bcl-2) aktivál, hanem a kaszpáz-kaszádót is (Haydar és mtsai., 1999). A kalcium/kalmodulin kináz II (CAMK II) kulcsszerepet játszik a hipoxás/hipoglikémiás állapotokat követő apoptotikus folyamatok

közvetítésében (Hajimohammadreza és mtsai., 1995), és a KA kezelést követően leírták az enzim aktivitásának fokozódását (Lee és mtsai., 2003).

A fent említettek és az eredményeink alapján elmondható, hogy a magas dózisban alkalmazott KA kezelés a felnőtt patkányok intakt idegrendszerében károsítja a szinaptikus plaszticitást, amíg az általunk is használt alacsonyabb dózis (5mg/ttkg) posztischaemiás körülmények között képes helyreállítani a glutamáterg szinaptikus jeltovábbítás folyamatait és normalizálni a dendrittüskék sűrűségét a hippocampus területén.

A posztkondicionálás önálló hatásait sajnos nagyon nehéz különválasztva tanulmányozni magától az ischaemiás eseménytől, az azonban bizonyosnak tűnik, hogy a KARs fiziológiai aktivációja során elinduló folyamatokkal sok közös pontot mutatnak. A *de novo* szintetizálódó fehérjék, mint például a hő sokk fehérjék (Kirino és mtsai., 1991; Kitagawa és mtsai., 1991; Liu és mtsai., 1993), a Bcl-2 (Shimazaki és mtsai., 1994), szuperoxid-dizmutáz (MnSOD) (Bordet és mtsai., 2000) és az apoptózis gátló, túlélő fehérje (inhibitor-of-apoptosis, IAP) (Tanaka és mtsai., 2004) hozzájárulnak a késői ischaemiás tolerancia kialakulásához és képesek megfékezni a késleltetett neuronpusztulást akár 2 nappal az ischaemiás inzultust követően. Ha a posztkondicionálást megelőzően vagy azzal párhuzamosan a fehérjék szintézisét gátló cikloheximidet is jutattunk az állatokba, a posztkondicionálás pozitív hatásai elmaradnak (Burda és mtsai., 2006; Danielisova és mtsai., 2006). Az utóbbi években kiderült az is, hogy a posztkondicionálás képes megakadályozni a citokrom-c és a MnSOD citoplazmába ürülését, mérsékelni a kaszpáz-3 és iNOS aktivitását (Danielisova és mtsai., 2009), továbbá jelentősen csökkentheti a Glu koncentrációját átmeneti globális ischaemiát követően (Kravcukova és mtsai., 2010).

A munkacsoportunk eredményei alapján elmondható, hogy a KA-al történő posztkondicionálás globális hipoperfúziót követően képes indukálni a dendrittüskék képződését a hippocampus CA1-es régiójában, amely egyúttal az új, serkentő szinapszisok kialakulását is jelzi. Az új kapcsolatok által kialakított hippocampális neuronális hálózatok az *in vitro* elektrofiziológiai méréseink alapján „normálisan” funkcionáltak. A KA, mint második patofiziológias stresszor, csak az ischaemiás inzultust követő második napon bizonyult hatásosnak, amely egy sajátos terápiás időintervallumot jelent. Ez összhangban áll más kutatócsoportok által tapasztalt eredményekkel beleértve az ischaemiás és farmakológia posztkondicionálást is, amelyek hatásossága az irodalmi adatok alapján 6 órától (Ren és mtsai., 2008) 2 napig (Burda és mtsai., 2005; Burda és mtsai., 2006; Danielisova és mtsai., 2008; Danielisova és mtsai., 2009) terjed.

További kísérletek szükségesek azonban az itt bemutatott KA által közvetített védőhatások háttérben álló mechanizmusok alaposabb megértéséhez, valamint más, posztkondicionáláshoz használható stresszorok teszteléséhez egyaránt.

Összefoglaló

Az idegrendszeret érintő betegségek közül leggyakoribb eset az, amikor átmeneti vagy tartós vérellátási zavar alakul ki (hipoperfúzió, stroke). Az ischaemiás állapot következtében a fiziológiásnál jóval több glutamát (Glu) szabadul fel a neuronokból az agy intersticiális folyadékába. Fiziológiás körülmények kötött a Glu serkentő neurotranszmitterként vesz részt az idegrendszer szinaptikus folyamataiban. A kórosan magas Glu koncentráció azonban excitotoxicitást okoz, amely az idegsejtek halálához vezethet. A folyamat során megnő a Ca^{2+} -ion beáramlás a sejtekbe, ami megemeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt. A megemelkedett Ca^{2+} -szint pedig különböző enzimek aktiválásával apoptotikus folyamatokat indít be.

Az utóbbi években kiderült az, hogy az agyban felgyülemlett felesleges Glu-ot a keringésbe jutatott oxálecetsav (OxAc) képes lecsökkenteni a vér közvetítésével. A megemelkedett Glu-szintet normál esetben a Na^+ -függő serkentő aminosav transzporterek (EAAT-k) csökkentik le. Ezek a transzporterek megtalálhatók az idegsejtek axonterminálisain az asztrocitákon, valamint az agyi endotél falában is. Ez utóbbiak az agyból a vérbe történő Glu transzportért felelősek. A vérben található glutamát-oxálecetsav transzamináz (GOT) enzim a Glu és koszubsztrátja (OxAc) jelenlétében a Glu-ot α -ketoglutaráttá alakítja át. Ha a vérben megnöveljük az OxAc szintjét, akkor azzal lecsökkenthetjük a vér Glu-tartalmát, és így ezzel egy "szívóhatást" alakíthatunk ki a megemelkedett agyi Glu-szint számára, fokozva az agyból a vérbe történő Glu-transzport mértékét (netto Glu efflux).

1.,2.

Az első kísérletsorozatunkban hím Wistar patkányokat használtunk, amelyek agykérgén fototrombotikus lézióval idéztünk elő fokális ischaemiás állapotot. Az ischaemiás inzultust követően egy egyszeri, 30 percen át tartó OxAc kezelést (12 mg/ttkg) alkalmaztunk. A lézió kiváltását követően a sérülés kiterjedését és az elhalt idegsejtek számát Fluoro-Jade B (FJB) festés segítségével határoztuk meg. A FJB egy fluorokróm festék, amely szelektíven kötődik a sérült neuronokhoz. A túlélési idő után koronális agyszeleteket készítettünk a teljes lézió területéről, fagyasztva metsző mikrotom segítségével. A FJB festés után a sorozatmetszeteket fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg. A lézió átesett kezeletlen (pozitív kontroll) és a lézió után OxAc kezelt csoportban is megvizsgáltuk a lézió térfogatát és az elhalt, FJB-pozitív sejtek számát.

Az OxAc kezelés a hisztológiai eredmények alapján neuroprotektívnek bizonyult, hiszen csökkentette a fokális agykérgi ischaemia által okozott károsodás mértékét. A fototrombotikus léziót követően az esetleges funkcionális károsodásokat is megvizsgáltuk *in vivo* elektrofiziológiai mérések segítségével. A vizsgálatokhoz az állatok trigeminális rendszerét aktiváltuk a bajuszpárnák elektromos ingerlésével, majd a szomatoszenzoros kéreg feletti ép koponyacsont felületéről kiváltott potenciálokat vezettük el különböző koordinátákról. Az ischaemiás inzultus a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válaszok (SEPs) amplitúdójának jelentős csökkenését eredményezte, amelyet azonban az OxAc utókezeléssel szignifikánsan mérsékelni lehetett. Feltételezhetjük, hogy az OxAc neuroprotektív hatását a vér Glu tartalmának redukálása révén fejtí ki, amely fokozza az agyból a vérbe történő Glu efflux mértékét, ezáltal lecsökkentve a kórosan magas Glu szintet az agyban. Az OxAc kezelés csökkenti a penumbra kiterjedését, javítja a sérült szövet vérellátását és oxigenáltságát, továbbá mérsékli a fokális ischaemia által okozott funkcionális károsodást is.

A globális hipoperfúzió központi idegrendszert érintő következményei a 2VO-t követően jelentkező kevésbé jelentős szinaptikus plaszticitás-romlásától a 4VO után tapasztalható kiterjedt sejtpusztulásig terjedhet. Ezek a károsodások elsősorban az ischaemiás/hipoxiás állapotokra leginkább érzékeny agyterületeken figyelhetők meg, mint a hippocampus CA1-es régiója. A hosszútávú szinaptikus fokozódás jelensége, azaz az LTP a legelfogadottabb módszer a memória és a tanulás sejtszintű mechanizmusainak vizsgálatához. A hipoperfúzió nem okoz hisztológiai módszerekkel kimutatható sejtpusztulást, azonban a dendrittüskék számának csökkenése már önmagában felelős lehet az LTP kiválthatóságának jelentős romlásában a hippocampális CA1-es régióban, mivel a dendrittüskék adják a legfőbb serkentő, glutamáterg bemeneteket a neuronokon. Patológias körülmények között, mint az ischaemiás agyban is, a dendrittüskék sűrűsége és morfológiája jelentősen megváltozhat. A hosszabb dendrittüskék képesek a hálózat szintjén a sejtestet biokémiai és elektromosan izolálni a lokális excitotoxikus hatásoktól, így megakadályozhatják az apoptikus folyamatok elindulását.

Az ischaemiás posztkondicionálás célja az ischaemiás/reperfúziós károsodás kivédése, mind szív, mind agyi infarktust követően. A közelmúltban kiderült az, hogy a posztkondicionálás sokféle, önmagában káros anyag utólagos alkalmazásával kiváltható, amelyeket így második patofiziológias stresszornak tekinthetünk. Az utókezelés időpontja az alkalmazott anyagtól és stratégiától függően néhány perctől, akár 2 napig is terjedhet.

Az ionotróp Glu receptorok családjába tartozó kainát receptorok (KAR-ok), az idegrendszer számos területén fontos szerepet játszanak a glutamáterg jeltovábbításban és a szinaptikus plaszticitásban egyaránt. Az említett receptorok agonistája a Glu analóg kainsav (KA), egy neurotoxikus anyag, amelyet először a *Digenea simplex*-ből vontak ki.

A disszertáció második felében bemutatott kísérletsorozatban a KA posztkondicionálás esetleges neuroprotektív hatásait vizsgáltuk az ischaemiás inzultust követően különböző időpontokban alkalmazva.

3.,4.

Átmeneti, 30 percig tartó globális előagyi hipoperfúziót a két arteria carotis communis reverzibilis leszorításával (2VO) idéztünk elő, hím Wistar patkányokon. A 2VO funkcionális hatásait a Schaffer kollaterálisok és a CA1-es piramis sejtek közötti szinapszisokban az LTP kiválthatóságával, az alapvető glutamáterg jeltovábbítás folyamatait pedig input/output (I/O) görbék felvételével tanulmányoztuk hippocampális agyszeleteken. Az ischaemiás inzultus által kiváltott morfológiai károsodásokat a CA1-es piramis sejtek apikális dendritikus denzitás változásán keresztül vizsgáltuk.

Az *in vitro* elektrofiziológiai mérésekhez koronális agyszeleteket készítettünk, amelyek a hippocampust is tartalmazták. Az LTP kiváltásához egy rövid kontroll periódust követően magas frekvenciás ingerlést (HFS) alkalmaztunk és 60 percen keresztül vizsgáltuk a mezőpotenciálok (fEPSPs) amplitúdójának változásait. A dendritikus számának meghatározásához Golgi-Cox festést használtunk, majd vibratom segítségével koronális agyszeleteket készítettünk, amelyeket fénymikroszkóppal vizsgáltunk. A 2VO jelentős funkcionális károsodást és morfológiai elváltozást okozott a hippocampus CA1-es régiójában. A KA-al történő posztkondicionálás (5 mg/ttkg) az ischaemiás inzultust követően közvetlenül vagy 24 óra után alkalmazva nem bizonyult neuroprotektívnek. Azonban, ha a kezelés 48 órával a 2VO-t követően történt az LTP kiválthatósága, az I/O görbék és a dendritikus denzitása megközelítette a kontroll értékeket.

Kísérleti eredményeink alapján elmondható az, hogy a KA-al történő posztkondicionálás globális hipoperfúziót követően képes indukálni a dendritikus képződését a hippocampus CA1-es régiójában, amely egyúttal az új, serkentő szinapszisok kialakulását is jelzi. Az új kapcsolatok által kialakított neuronális hálózatok az *in vitro* elektrofiziológiai méréseink alapján „normálisan” funkcionáltak. A KA, mint második patofiziológiai stresszor, csak az ischaemiás inzultust követő második napon bizonyult hatásosnak, amely egy sajátos terápiás időintervallumot jelent.

Summary

Glutamate (Glu) is the major excitatory amino acid neurotransmitter in the central nervous system. It mediates a number of physiological processes, but it is involved in the pathological processes of excitotoxicity too. Traumatic brain injury, focal brain lesion or global hypoperfusion are followed by acute excitotoxicity, a result of overexcitation of the Glu receptors and a cellular calcium overload caused by the presence of abnormally high Glu levels in the cerebrospinal and interstitial fluids. These changes are among the key factors of cell death in brain ischaemia.

It has recently been demonstrated that excess Glu in the brain can be eliminated by the intravenous administration of oxaloacetate (OxAc). Glu transporters located on the brain vasculature play an important role in controlling extracellular Glu levels via a brain-to-blood Glu efflux. The brain-to-blood Glu efflux mediated by Na⁺ dependent excitatory amino acid transporters and greatly enhanced by the blood Glu scavenger OxAc which, upon intravenous administration activate the blood-resident glutamate-oxaloacetate transaminase, respectively, causing Glu deamination into α -ketoglutarate. The scavenging of blood Glu increases the driving force for a brain-to-blood Glu efflux and leads to a neuroprotective decrease in the excess Glu present in the brain extracellular fluids.

In this study, we subjected rats to a photothrombotic lesion and treated them after the illumination with a single 30-min long administration of OxAc (12 mg/bwkg, i.v.). Following induction of the lesion, we measured the infarct size by Fluoro-Jade B (FJB) staining. FJB binds sensitively and specifically to damaged neurons, with increased contrast during acute neuronal stress. Coronal sections (30 μ m) were cut with a freezing microtome and the sections were stained with FJB. The sections were subsequently analyzed with a fluorescent microscope. The volume of the hemispheric lesion and the number of FJB-positive cells were calculated for each animal. The administration of OxAc resulted in a reduction in the volume of the ischemia-induced cortical damage.

We also examined the functional consequences of the photothrombotic lesion by measuring the amplitudes of the somatosensory evoked potentials (SEPs). SEPs were induced in the contralateral primary somatosensory cortex by electrical stimulation of the right whisker pad and were transcranially recorded. The photothrombotic lesion resulted in appreciably

decreased amplitudes of SEPs, but OxAc administration significantly attenuated this reduction.

We suggest that the neuroprotective effects of OxAc are due to its blood Glu scavenging activity, which, by increasing the brain-to-blood Glu efflux, reduces the excess Glu in the brain. This limits the size of the penumbra, improves the tissue perfusion and oxygenation and reduces the ischemia-related functional damage.

The cerebral consequences of global hypoperfusion can range from slight changes in synaptic plasticity, as seen after 2-vessel occlusion (2VO) to extensive cell death in vulnerable brain areas including the hippocampal CA1 region after 4-vessel-occlusion (4VO). The cortex and hippocampus are highly sensitive to hypoperfusion. 2VO (only the bilateral common carotid arteries are clamped) reduces the blood flow to one-third in rats. Through glutamatergic synapses, long-term potentiation (LTP) involved cellular mechanisms of learning and memory expresses mainly dendritic spines in the hippocampus and cortex. Any LTP malfunction in the ischemic hippocampus is paralleled by changes in dendritic spine density through remodeling of spines. Ischemic postconditioning is referred to preventing ischaemia/reperfusion injury in both myocardial and cerebral infarction. It has been recently demonstrated that postconditioning can be induced by a broad range of stimuli within minutes to days after an ischemic insult in the brain. A special form is elicited by pharmacological intervention called second pathophysiological stress. Kainic acid (KA), obtained first from the red alga *Digenea simplex*, is a potent agonist of the kainate class of ionotropic glutamatergic receptors, and hence a potent neuroexcitant through excitotoxicity.

The next study aimed to evaluate possible neuroprotective effects of kainate postconditioning with onsets 0, 24 and 48 h after the ischemic insult on the hippocampal synaptic plasticity.

Transient global hypoperfusion was induced in male Wistar rats by two-vessel occlusion (2VO) for 30 min. The hippocampal function was tested by LTP measurements of Schaffer collateral-CA1 pyramidal cell synapses in acute slices and the changes in density of dendritic spines on pyramidal cells at CA1 region.

For electrophysiological recordings we prepared coronal slices from the middle part of hippocampi. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were monitored and after a control period, LTP of the Schaffer collateral-CA1 synaptic response was induced by high-frequency stimulation (HFS). After the HFS the fEPSPs were recorded for at least a further 60 min-long period. In order to determine the number of apical dendritic spines we used Golgi-

Cox staining. When the impregnation was ready coronal brain sections were cut by vibratome. The clear Golgi sections have been evaluated by light microscopical stereology.

2VO causes inhibition of protein synthesis and leads to the decrease of dendritic spine number and resulted in an impaired long-term potentiation (LTP) function in the hippocampal CA1 region. Postconditioning 0 and 24 h after ischemia was not protective, whereas the application of kainate (5 mg/kg) 48 hours after the 2VO restored the damaged LTP function to the control level in parallel with the reappearance of a normal spine density.

Our experiments have demonstrated that KA treatment induces spine-genesis in the adult hippocampal CA1 subfield after incomplete global ischemia, which results in a normal-like functioning neural network. KA can be used as a pharmacological postconditioner only at the second post-ischemic day, revealing a very specific therapeutic window. These data clearly demonstrate the onset dependence of postconditioning in global ischemia, with restoration of the structural plasticity and hippocampal function.

Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretnék köszönetet nyilvánítani Dr. Toldi József tanszékvezető professzor úrnak, hogy megtisztelt bizalmával és biztosította a Ph.D. disszertációm elkészítéséhez szükséges feltételeket a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Farkas Tamásnak és Dr. Kis Zsoltnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk szakmai kérdéseimmal, valamint hogy a munkán kívül is számíthattam segítségükre. Köszönöm Rákos Gabriellának, aki segített elsajátítani a kísérleteimhez szükséges műtéti eljárásokat és hozzájárult ezen dolgozat elkészüléséhez. Továbbá szeretném megköszönni közvetlen kollégáimnak Marosi Máténak, Fuzik Jánosnak és Gellért Leventének, hogy megosztották velem hasznos tanácsaikat és nemcsak szakmailag, hanem barátilag is támogattak a munkám során. Köszönet illeti a munkacsoportunkban dolgozó hallgatókat is, akik munkájukkal szintén sokat segítettek a dolgozat elkészülésében. Külön köszönet Veketyné Váradi Margónak az adminisztratív ügyekben nyújtott rengeteg segítségért, valamint a tanszék valamennyi dolgozójának a kellemes légkörért, amiben az elmúlt években részesítettek.

Végül hálás köszönettel tartozom családomnak és barátnőmnek Kocsis Kittinek, amiért végig támogattak tanulmányaim során és folyamatos biztatásukkal átsegítettek a nehéz helyzeteken.

Irodalomjegyzék

- Akulinin, V. A., Stepanov, S. S., Semchenko, V. V., és Belichenko, P. V. (1997). Dendritic changes of the pyramidal neurons in layer V of sensory-motor cortex of the rat brain during the postresuscitation period. *Resuscitation* 35, 157-164.
- al-Sarraf, H., és Philip, L. (2003). Increased brain uptake and CSF clearance of ¹⁴C-glutamate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 994, 181-187.
- al-Sarraf, H., Preston, J. E., és Segal, M. B. (1995). The entry of acidic amino acids into brain and CSF during development, using in situ perfusion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 90, 151-158.
- al-Sarraf, H., Preston, J. E., és Segal, M. B. (1997a). Acidic amino acid accumulation by rat choroid plexus during development. *Brain Res Dev Brain Res* 102, 47-52.
- al-Sarraf, H., Preston, J. E., és Segal, M. B. (1997b). Changes in the kinetics of the acidic amino acid brain and CSF uptake during development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 102, 127-134.
- Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K. B., és Yuste, R. (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17961-17966.
- Armstrong-James, M., és Fox, K. (1987). Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex. *J Comp Neurol* 263, 265-281.
- Armstrong-James, M., Fox, K., és Das-Gupta, A. (1992). Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol* 68, 1345-1358.
- Arvidsson, J. (1982). Somatotopic organization of vibrissae afferents in the trigeminal sensory nuclei of the rat studied by transganglionic transport of HRP. *J Comp Neurol* 211, 84-92.
- Asai, Y., Umemura, K., Kohno, Y., Uematsu, T., és Nakashima, M. (1993). An animal model for hearing disturbance due to inner ear ischemia: photochemically induced thrombotic occlusion of the rat anterior inferior cerebellar artery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250, 292-296.
- Back, T., Kohno, K., és Hossmann, K. A. (1994). Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 12-19.
- Baik, M. W., Branston, N. M., Bentivoglio, P., és Symon, L. (1990). The effects of experimental brain-stem ischaemia on brain-stem auditory evoked potentials in primates. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 75, 433-443.
- Baker, A. J., Moulton, R. J., MacMillan, V. H., és Shedden, P. M. (1993). Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg* 79, 369-372.
- Bano, D., és Nicotera, P. (2007). Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38, 674-676.
- Barone, F. C., Feuerstein, G. Z., és White, R. F. (1997). Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 31-44.
- Barone, F. C., Schmidt, D. B., Hillegass, L. M., Price, W. J., White, R. F., Feuerstein, G. Z., Clark, R. K., Lee, E. V., Griswold, D. E., és Sarau, H. M. (1992). Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* 23, 1337-1347; discussion 1347-1338.
- Beart, P. M., és O'Shea, R. D. (2007). Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* 150, 5-17.

- Beck, T., Goller, H. J., és Wree, A. (1995). Chronic depression of glucose metabolism in postischemic rat brains. *Stroke* 26, 1107-1113.
- Belford, G. R., és Killackey, H. P. (1980). The sensitive period in the development of the trigeminal system of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 193, 335-350.
- Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375-403.
- Berl, S., Lajtha, A., és Waelsch, H. (1961). Amino acid and protein metabolism: VI. Cerebral compartments of glutamic acid metabolism. *J Neurochem* 7, 186-197.
- Bettler, B., és Mülle, C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123-139.
- Bickel, U., Yoshikawa, T., és Pardridge, W. M. (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 247-279.
- Biegon, A., Fry, P. A., Paden, C. M., Alexandrovich, A., Tsenter, J., és Shohami, E. (2004). Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5117-5122.
- Bleakman, D., és Lodge, D. (1998). Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37, 1187-1204.
- Bliss, T. V., és Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bliss, T. V., és Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Bonita, R. (1992). Epidemiology of stroke. *Lancet* 339, 342-344.
- Bordet, R., Deplanque, D., Maboudou, P., Puisieux, F., Pu, Q., Robin, E., Martin, A., Bastide, M., Leys, D., Lhermitte, M., és Dupuis, B. (2000). Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1190-1196.
- Bordi, F., Pietra, C., Ziviani, L., és Reggiani, A. (1997). The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat. *Exp Neurol* 145, 425-433.
- Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Delany, C. M., Parry, M. C., Smolders, I., Vignes, M., Ho, K. H., Miu, P., Brinton, B. T., Fantaske, R., és mtsai. (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402, 297-301.
- Bottiger, B. W., Grabner, C., Bauer, H., Bode, C., Weber, T., Motsch, J., és Martin, E. (1999). Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart* 82, 674-679.
- Bowen, K. K., Naylor, M., és Vemuganti, R. (2006). Prevention of inflammation is a mechanism of preconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Neurochem Int* 49, 127-135.
- Bridges, R. J., és Esslinger, C. S. (2005). The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol Ther* 107, 271-285.
- Brint, S., Jacewicz, M., Kiessling, M., Tanabe, J., és Pulsinelli, W. (1988). Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 474-485.
- Brown, C. E., Wong, C., és Murphy, T. H. (2008). Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke* 39, 1286-1291.

- Buchan, A. M., Gertler, S. Z., Li, H., Xue, D., Huang, Z. G., Chaundy, K. E., Barnes, K., és Lesiuk, H. J. (1994). A selective N-type Ca(2+)-channel blocker prevents CA1 injury 24 h following severe forebrain ischemia and reduces infarction following focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* *14*, 903-910.
- Buchan, A. M., Xue, D., és Slivka, A. (1992). A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* *23*, 273-279.
- Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J. J., Myseros, J., Choi, S. C., Ward, J. D., Marmarou, A., és Young, H. F. (1998). Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg* *89*, 507-518.
- Bunch, L., Erichsen, M. N., és Jensen, A. A. (2009). Excitatory amino acid transporters as potential drug targets. *Expert Opin Ther Targets* *13*, 719-731.
- Burda, J., Danielisova, V., Nemethova, M., Gottlieb, M., Matiasova, M., Domorakova, I., Mechirova, E., Ferikova, M., Salinas, M., és Burda, R. (2006). Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* *26*, 1141-1151.
- Burda, J., Matiasova, M., Gottlieb, M., Danielisova, V., Nemethova, M., Garcia, L., Salinas, M., és Burda, R. (2005). Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* *30*, 1397-1405.
- Büki, A. (2006). A baleseti agysérülések kezeléséről. *Élet és Tudomány*.
- Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Cupini, L., és Bernardi, G. (2003). Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol* *2*, 622-629.
- Castillo, J., Davalos, A., Naveiro, J., és Noya, M. (1996). Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* *27*, 1060-1065.
- Celsis, P., Agniel, A., Puel, M., Rascol, A., és Marc-Vergnes, J. P. (1987). Focal cerebral hypoperfusion and selective cognitive deficit in dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *50*, 1602-1612.
- Chan, P. H. (1996). Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* *27*, 1124-1129.
- Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O. P., Danbolt, N. C., és Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* *15*, 711-720.
- Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R. A., Zhu, R. L., Graham, S. H., és Simon, R. P. (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* *18*, 4914-4928.
- Chiaia, N. L., Bennett-Clarke, C. A., és Rhoades, R. W. (1992). Differential effects of peripheral damage on vibrissa-related patterns in trigeminal nucleus principalis, subnucleus interpolaris, and subnucleus caudalis. *Neuroscience* *49*, 141-156.
- Chiaia, N. L., Rhoades, R. W., Bennett-Clarke, C. A., Fish, S. E., és Killackey, H. P. (1991a). Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol* *314*, 201-216.
- Chiaia, N. L., Rhoades, R. W., Fish, S. E., és Killackey, H. P. (1991b). Thalamic processing of vibrissal information in the rat: II. Morphological and functional properties of medial ventral posterior nucleus and posterior nucleus neurons. *J Comp Neurol* *314*, 217-236.
- Chittajallu, R., Braithwaite, S. P., Clarke, V. R., és Henley, J. M. (1999). Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* *20*, 26-35.

- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K. K., Barnes, J. M., Collingridge, G. L., és Henley, J. M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379, 78-81.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Choi, D. W. (1994). Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 100, 47-51.
- Christensen, J. K., Paternain, A. V., Selak, S., Ahring, P. K., és Lerma, J. (2004). A mosaic of functional kainate receptors in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24, 8986-8993.
- Clarke, V. R., Ballyk, B. A., Hoo, K. H., Mandelzys, A., Pellizzari, A., Bath, C. P., Thomas, J., Sharpe, E. F., Davies, C. H., Ornstein, P. L., és mtsai. (1997). A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 389, 599-603.
- Clarke, V. R., és Collingridge, G. L. (2002). Characterisation of the effects of ATPA, a GLU(K5) receptor selective agonist, on excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 42, 889-902.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J. C., Bernard, C., és Ben-Ari, Y. (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1, 470-478.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- Danielisova, V., Gottlieb, M., Nemethova, M., és Burda, J. (2007). Activities of endogenous antioxidant enzymes in the cerebrospinal fluid and the hippocampus after transient forebrain ischemia in rat. *J Neurol Sci* 253, 61-65.
- Danielisova, V., Gottlieb, M., Nemethova, M., és Burda, J. (2008). Effects of bradykinin postconditioning on endogenous antioxidant enzyme activity after transient forebrain ischemia in rat. *Neurochem Res* 33, 1057-1064.
- Danielisova, V., Gottlieb, M., Nemethova, M., Kravcukova, P., Domorakova, I., Mechirova, E., és Burda, J. (2009). Bradykinin postconditioning protects pyramidal CA1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 29, 871-878.
- Danielisova, V., Nemethova, M., Gottlieb, M., és Burda, J. (2006). The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1181-1191.
- De Jong, G. I., Farkas, E., Stienstra, C. M., Plass, J. R., Keijser, J. N., de la Torre, J. C., és Luiten, P. G. (1999). Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience* 91, 203-210.
- de la Torre, J. C. (1999). Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? *Acta Neuropathol (Berl)* 98, 1-8.
- de la Torre, J. C., Fortin, T., Park, G. A., Butler, K. S., Kozlowski, P., Pappas, B. A., de Socarraz, H., Saunders, J. K., és Richard, M. T. (1992). Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res* 582, 186-195.
- Derdeyn, C. P., Videen, T. O., Fritsch, S. M., Carpenter, D. A., Grubb, R. L., Jr., és Powers, W. J. (1999). Compensatory mechanisms for chronic cerebral hypoperfusion in patients with carotid occlusion. *Stroke* 30, 1019-1024.
- Desagher, S., Glowinski, J., és Premont, J. (1997). Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17, 9060-9067.
- Dietrich, W. D., Busto, R., Alonso, O., Globus, M. Y., és Ginsberg, M. D. (1993). Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 541-549.

- Dietrich, W. D., Busto, R., Watson, B. D., Scheinberg, P., és Ginsberg, M. D. (1987a). Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 72, 326-334.
- Dietrich, W. D., Watson, B. D., Busto, R., Ginsberg, M. D., és Bethea, J. R. (1987b). Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol* 72, 315-325.
- Dingledine, R., McBain, C. J., és McNamara, J. O. (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 11, 334-338.
- Dirnagl, U., Simon, R. P., és Hallenbeck, J. M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26, 248-254.
- Dosenko, V. E., Nagibin, V. S., Tumanovskaya, L. V., Zagoriy, V. Y., Moibenko, A. A., és Vaage, J. (2006). Proteasome inhibitors eliminate protective effect of postconditioning in cultured neonatal cardiomyocytes. *Fiziol Zh* 52, 15-24.
- Dumas, T. C., és Sapolsky, R. M. (2001). Gene therapy against neurological insults: sparing neurons versus sparing function. *Trends Neurosci* 24, 695-700.
- Duverger, D., és MacKenzie, E. T. (1988). The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 449-461.
- Eckstein, M., Stratton, S. J., és Chan, L. S. (2005). Cardiac Arrest Resuscitation Evaluation in Los Angeles: CARE-LA. *Ann Emerg Med* 45, 504-509.
- el-Rahman, A., Hammouda, M. A., és Fakeir, A. (1995). Flow cytometric evaluation of erythrocyte response to oxidant stress. *Cytometry* 20, 19-22.
- Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S., és Vink, R. (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798-800.
- Farkas, B., Tantos, A., Schlett, K., Vilagi, I., és Friedrich, P. (2004). Ischemia-induced increase in long-term potentiation is warded off by specific calpain inhibitor PD150606. *Brain Res* 1024, 150-158.
- Farkas, E., de Wilde, M. C., Kiliaan, A. J., és Luiten, P. G. (2002). Chronic cerebral hypoperfusion-related neuropathologic changes and compromised cognitive status: window of treatment. *Drugs Today (Barc)* 38, 365-376.
- Farkas, E., és Luiten, P. G. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64, 575-611.
- Farkas, E., Luiten, P. G., és Bari, F. (2007). Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54, 162-180.
- Farkas, T., Racekova, E., Kis, Z., Horvath, S., Burda, J., Galik, J., és Toldi, J. (2003). Peripheral nerve injury influences the disinhibition induced by focal ischaemia in the rat motor cortex. *Neurosci Lett* 342, 49-52.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V., és Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18, 8900-8911.
- Fiala, J. C., Spacek, J., és Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39, 29-54.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., és Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854.
- Frerking, M., és Nicoll, R. A. (2000). Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10, 342-351.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., és Nicoll, R. A. (2001). Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J Neurosci* 21, 2958-2966.

- Gao, X., Ren, C., és Zhao, H. (2008a). Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning. *J Neurosci Res* 86, 2505-2511.
- Gao, X., Zhang, H., Takahashi, T., Hsieh, J., Liao, J., Steinberg, G. K., és Zhao, H. (2008b). The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *J Neurochem* 105, 943-955.
- Garcia-Galloway, E., Arango, C., Pons, S., és Torres-Aleman, I. (2003). Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling. *Mol Cell Neurosci* 24, 1027-1037.
- Gasparova, Z., Jariabka, P., és Stolc, S. (2008). Effect of transient ischemia on long-term potentiation of synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuro Endocrinol Lett* 29, 702-705.
- Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., és Morrell, F. (1991). Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res* 566, 77-88.
- Gibb, R., és Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 79, 1-4.
- Girotti, A. W., Thomas, J. P., és Jordan, J. E. (1985). Inhibitory effect of zinc(II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *J Free Radic Biol Med* 1, 395-401.
- Glaser, E. M., és Van der Loos, H. (1981). Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods* 4, 117-125.
- Globus, M., és Liversage, R. A. (1975). In vitro studies of limb regeneration in adult *Diemictylus viridescens*: neural dependence of blastema cells for growth and differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 33, 813-829.
- Gonzalez-Burgos, I., Letechipia-Vallejo, G., Lopez-Loeza, E., Morali, G., és Cervantes, M. (2007). Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 423, 162-166.
- Gottlieb, M., Wang, Y., és Teichberg, V. I. (2003). Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *J Neurochem* 87, 119-126.
- Gray, W. P., és Sundstrom, L. E. (1998). Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790, 52-59.
- Greuel, J. M., Luhmann, H. J., és Singer, W. (1988). Pharmacological induction of use-dependent receptive field modifications in the visual cortex. *Science* 242, 74-77.
- Guyot, L. L., Diaz, F. G., O'Regan, M. H., McLeod, S., Park, H., és Phillis, J. W. (2001). Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model. *Neurosci Lett* 299, 37-40.
- Hajimohammadreza, I., Probert, A. W., Coughenour, L. L., Borosky, S. A., Marcoux, F. W., Boxer, P. A., és Wang, K. K. (1995). A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II provides neuroprotection against NMDA- and hypoxia/hypoglycemia-induced cell death. *J Neurosci* 15, 4093-4101.
- Harris, K. M., Fiala, J. C., és Ostroff, L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 745-748.
- Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Flavell, R. A., és Rakic, P. (1999). The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex* 9, 621-626.

- Herkenham, M. (1980). Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science* 207, 532-535.
- Hermann, D. M., Hossmann, K. A., és Mies, G. (2004). Expression of c-jun, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, caspase-3 and glial fibrillary acidic protein following cortical cold injury in rats: relationship to metabolic disturbances and delayed cell death. *Neuroscience* 123, 371-379.
- Hermann, D. M., Mies, G., és Hossmann, K. A. (1999). Lesion-remote metabolic changes after neocortical cold injury in rats. *Neuroreport* 10, 759-763.
- Hodgkins, P. S., Wu, H. Q., Zielke, H. R., és Schwarcz, R. (1999). 2-Oxoacids regulate kynurenic acid production in the rat brain: studies in vitro and in vivo. *J Neurochem* 72, 643-651.
- Hollmann, M., és Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17, 31-108.
- Horner, R. D. (1998). The high cost of stroke to society, the family, and the patient. *Pharmacotherapy* 18, 87S-93S; discussion 85S-86S.
- Hoyte, L., Kaur, J., és Buchan, A. M. (2004). Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Exp Neurol* 188, 200-204.
- Huettner, J. E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 70, 387-407.
- Hugel, S., Abegg, M., de Paola, V., Caroni, P., Gahwiler, B. H., és McKinney, R. A. (2009). Dendritic spine morphology determines membrane-associated protein exchange between dendritic shafts and spine heads. *Cereb Cortex* 19, 697-702.
- Iliodromitis, E. K., Georgiadis, M., Cohen, M. V., Downey, J. M., Bofilis, E., és Kremastinos, D. T. (2006). Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 101, 502-507.
- Isaac, J. T., Mellor, J., Hurtado, D., és Roche, K. W. (2004). Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 104, 163-172.
- Izumi, Y., Benz, A. M., Zorumski, C. F., és Olney, J. W. (1994). Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 5, 617-620.
- Jaako, K., Zharkovsky, T., és Zharkovsky, A. (2009). Effects of repeated citalopram treatment on kainic acid-induced neurogenesis in adult mouse hippocampus. *Brain Res* 1288, 18-28.
- Jacquin, M. F., Chiaia, N. L., Haring, J. H., és Rhoades, R. W. (1990). Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosens Mot Res* 7, 399-420.
- Jaskolski, F., Coussen, F., és Mulle, C. (2005). Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26, 20-26.
- Jatzke, C., Watanabe, J., és Wollmuth, L. P. (2002). Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. *J Physiol* 538, 25-39.
- Jensen, K. F., és Killackey, H. P. (1987). Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci* 7, 3529-3543.
- Johnston, M. V., Trescher, W. H., Ishida, A., és Nakajima, W. (2001). Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 49, 735-741.
- Jones, T. H., Morawetz, R. B., Crowell, R. M., Marcoux, F. W., FitzGibbon, S. J., DeGirolami, U., és Ojemann, R. G. (1981). Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 54, 773-782.

- Jorgensen, H. S., Kammersgaard, L. P., Nakayama, H., Raaschou, H. O., Larsen, K., Hubbe, P., és Olsen, T. S. (1999). Treatment and rehabilitation on a stroke unit improves 5-year survival. A community-based study. *Stroke* 30, 930-933.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kandel, E. R. (2004). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 24, 475-522.
- Kandel, E. R., és Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218, 433-443.
- Karhunen, H., Jolkkonen, J., Sivenius, J., és Pitkanen, A. (2005). Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochem Res* 30, 1529-1542.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., és Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26, 360-368.
- Kharlamov, A., Uz, T., Joo, J. Y., és Manev, H. (1996). Pharmacological characterization of apoptotic cell death in a model of photothrombotic brain injury in rats. *Brain Res* 734, 1-9.
- Kidwell, C. S., és Warach, S. (2003). Acute ischemic cerebrovascular syndrome: diagnostic criteria. *Stroke* 34, 2995-2998.
- Kin, H., Zatta, A. J., Lofye, M. T., Amerson, B. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Zhao, Z. Q., Guyton, R. A., Headrick, J. P., és Vinten-Johansen, J. (2005). Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 67, 124-133.
- Kinouchi, H., Epstein, C. J., Mizui, T., Carlson, E., Chen, S. F., és Chan, P. H. (1991). Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11158-11162.
- Kirino, T., Tsujita, Y., és Tamura, A. (1991). Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11, 299-307.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Kimura, K., és Kamada, T. (1991). 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 561, 203-211.
- Kitano, H., Young, J. M., Cheng, J., Wang, L., Hurn, P. D., és Murphy, S. J. (2007). Gender-specific response to isoflurane preconditioning in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1377-1386.
- Kleinschnitz, C., Braeuninger, S., Pham, M., Austinat, M., Nolte, I., Renne, T., Nieswandt, B., Bendszus, M., és Stoll, G. (2008). Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway-driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis. *Stroke* 39, 1262-1268.
- Krause, G. S., Kumar, K., White, B. C., Aust, S. D., és Wiegenstein, J. G. (1986). Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanisms of tissue injury and prospects for protection. *Am Heart J* 111, 768-780.
- Kravcukova, P., Danielisova, V., Nemethova, M., Burda, J., és Gottlieb, M. (2010). Delayed postconditioning reduces glutamate concentration in brain after transient global ischemia in rat. Paper presented at: 7th FENS Forum of European Neuroscience (Amsterdam, The Netherlands).
- Kriz, J. (2006). Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol* 18, 145-157.
- Krolukowski, J. G., Weihrauch, D., Bienengraeber, M., Kersten, J. R., Warltier, D. C., és Pagel, P. S. (2006). Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* 53, 174-182.

- Kruman, I., Bruce-Keller, A. J., Bredesen, D., Waeg, G., és Mattson, M. P. (1997). Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* *17*, 5089-5100.
- Kudo, T., Tada, K., Takeda, M., és Nishimura, T. (1990). Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* *21*, 1205-1209.
- Kullmann, D. M. (2001). Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* *32*, 561-564.
- Ladds, A., Branston, N. M., Vajda, J., McGillicuddy, J. E., és Symon, L. (1988). Changes in somatosensory evoked potentials following an experimental focal ischaemic lesion in thalamus. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* *71*, 233-240.
- Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., és Zakharenko, S. S. (2004). Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16665-16670.
- Lauri, S. E., Segerstrale, M., Vesikansa, A., Maingret, F., Mulle, C., Collingridge, G. L., Isaac, J. T., és Taira, T. (2005). Endogenous activation of kainate receptors regulates glutamate release and network activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* *25*, 4473-4484.
- Lauri, S. E., Vesikansa, A., Segerstrale, M., Collingridge, G. L., Isaac, J. T., és Taira, T. (2006). Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron* *50*, 415-429.
- Laver, S., Farrow, C., Turner, D., és Nolan, J. (2004). Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med* *30*, 2126-2128.
- Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Gray, A., Petersen, S., és Rayner, M. (2006). Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* *27*, 1521-1522.
- Lee, H. K., Choi, S. S., Han, K. J., Han, E. J., és Suh, H. W. (2003). Cycloheximide inhibits neurotoxic responses induced by kainic acid in mice. *Brain Res Bull* *61*, 99-107.
- Lee, J. J., Li, L., Jung, H. H., és Zuo, Z. (2008). Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats. *Anesthesiology* *108*, 1055-1062.
- Lee, J. K., Park, M. S., Kim, Y. S., Moon, K. S., Joo, S. P., Kim, T. S., Kim, J. H., és Kim, S. H. (2007). Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol* *67*, 620-625; discussion 625.
- Lee, J. Y., Kim, Y. H., és Koh, J. Y. (2001). Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* *21*, RC171.
- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., és Danbolt, N. C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* *15*, 1835-1853.
- Leigh, P. N., és Meldrum, B. S. (1996). Excitotoxicity in ALS. *Neurology* *47*, S221-227.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* *4*, 481-495.
- Li, Z., Zhou, R., Cui, S., Xie, G., Cai, W., Sokabe, M., és Chen, L. (2006). Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor. *Neuropharmacology* *51*, 958-966.
- Lim, C., Alexander, M. P., LaFleche, G., Schnyer, D. M., és Verfaellie, M. (2004). The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology* *63*, 1774-1778.

- Liu, X., Branston, N. M., Kawauchi, M., Jellinek, D. A., és Symon, L. (1992). Electrical stimulation of motor cortex in experimental cortical ischaemia: pyramidal responses at C5 and the surface EMG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 85, 209-214.
- Liu, Y., Kato, H., Nakata, N., és Kogure, K. (1993). Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience* 56, 921-927.
- Lur, G., Rakos, G., Juhasz-Vedres, G., Farkas, T., Kis, Z., és Toldi, J. (2006). Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on the evoked cortical activity of controls and of brain-injured rats. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1505-1519.
- Luscher, C., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., és Muller, D. (2000). Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 3, 545-550.
- Lyden, P., és Wahlgren, N. G. (2000). Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 9, 9-14.
- Lye, R. H., Shrewsbury-Gee, J., Slater, P., és Latham, A. (1987). Rat middle cerebral artery occlusion: use of evoked potentials and tetrazolium staining to assess chronic ischaemia. *J Neurosci Methods* 22, 133-139.
- MacLusky, N. J., Luine, V. N., Hajszan, T., és Leranath, C. (2005). The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology* 146, 287-293.
- Madsen, J. R., MacDonald, P., Irwin, N., Goldberg, D. E., Yao, G. L., Meiri, K. F., Rimm, I. J., Stieg, P. E., és Benowitz, L. I. (1998). Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 154, 673-683.
- Majewska, A., Brown, E., Ross, J., és Yuste, R. (2000). Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J Neurosci* 20, 1722-1734.
- Marchal, C., és Mulle, C. (2004). Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol* 561, 27-37.
- Marosi, M., Fuzik, J., Nagy, D., Rakos, G., Kis, Z., Vecsei, L., Toldi, J., Ruban-Matuzani, A., Teichberg, V. I., és Farkas, T. (2009). Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion. *Eur J Pharmacol* 604, 51-57.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., és Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.
- Matsumoto, K., Yamada, K., Kohmura, E., Kinoshita, A., és Hayakawa, T. (1994). Role of pyruvate in ischaemia-like conditions on cultured neurons. *Neurol Res* 16, 460-464.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C., és Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- Mattson, M. P., Culmsee, C., és Yu, Z. F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301, 173-187.
- Maus, M., Marin, P., Israel, M., Glowinski, J., és Premont, J. (1999). Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11, 3215-3224.
- Mies, G., Iijima, T., és Hossmann, K. A. (1993). Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709-711.
- Mikati, M. A., Holmes, G. L., Chronopoulos, A., Hyde, P., Thurber, S., Gatt, A., Liu, Z., Werner, S., és Stafstrom, C. E. (1994). Phenobarbital modifies seizure-related brain injury in the developing brain. *Ann Neurol* 36, 425-433.

- Minamide, H., Onishi, H., Yamashita, J., és Ikeda, K. (1994). Reversibility of transient focal cerebral ischemia evaluated by somatosensory evoked potentials in cats. *Surg Neurol* 42, 138-147.
- Mongan, P. D., Fontana, J. L., Chen, R., és Bungler, R. (1999). Intravenous pyruvate prolongs survival during hemorrhagic shock in swine. *Am J Physiol* 277, H2253-2263.
- Montana, V., Malarkey, E. B., Verderio, C., Matteoli, M., és Parpura, V. (2006). Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54, 700-715.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G. T., Brana, C., O'Gorman, S., Bettler, B., és Heinemann, S. F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28, 475-484.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., és Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Na, H. S., Kim, Y. I., Yoon, Y. W., Han, H. C., Nahm, S. H., és Hong, S. K. (1996). Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J* 132, 78-83.
- Nadler, J. V. (1981). Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29, 2031-2042.
- Nadler, J. V., Perry, B. W., és Cotman, C. W. (1978). Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271, 676-677.
- Nagababu, E., és Rifkind, J. M. (1998). Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 592-596.
- Nagababu, E., és Rifkind, J. M. (2004). Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 6, 967-978.
- Nagy Z, Magyar G, Óváry Cs (2000): Magyarországi stroke-betegek epidemiológiai vizsgálata. *Agyérbetegségek* 6: 2-10.
- Nagy, K., Domoki, F., és Bari, F. (2005). [Ischemic preconditioning in the brain]. *Ideggyogy Sz* 58, 305-313.
- National, H. o. D. a. O. A. (2005). Reducing brain damage: Faster access to better stroke care.
- Nicotera, P., Leist, M., Fava, E., Berlucchi, L., és Volbracht, C. (2000). Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol* 10, 276-282.
- Nitta, I., Watase, H., és Tomiie, Y. (1958). Structure of kainic acid and its isomer, allokainic acid. *Nature* 181, 761-762.
- Norton, S., és Culver, B. (1977). A Golgi analysis of caudate neurons in rats exposed to carbon monoxide. *Brain Res* 132, 455-465.
- Noshita, N., Sugawara, T., Hayashi, T., Lewen, A., Omar, G., és Chan, P. H. (2002). Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 22, 7923-7930.
- O'Kane, R. L., Martinez-Lopez, I., DeJoseph, M. R., Vina, J. R., és Hawkins, R. A. (1999). Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 274, 31891-31895.
- Obal, D., Dettwiler, S., Favocchia, C., Scharbatke, H., Preckel, B., és Schlack, W. (2005). The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg* 101, 1252-1260.

- Obernier, J. A., White, A. M., Swartzwelder, H. S., és Crews, F. T. (2002). Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 521-532.
- Ohta, H., Nishikawa, H., Kimura, H., Anayama, H., és Miyamoto, M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 79, 1039-1050.
- Oldendorf, W. H. (1971). Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 221, 1629-1639.
- Olney, J. W., Rhee, V., és Ho, O. L. (1974). Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 77, 507-512.
- Park, J. S., Bateman, M. C., és Goldberg, M. P. (1996). Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Dis* 3, 215-227.
- Pawlik, G., Rackl, A., és Bing, R. J. (1981). Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res* 208, 35-58.
- Paxinos, G., és Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Peberdy, M. A., Kaye, W., Ornato, J. P., Larkin, G. L., Nadkarni, V., Mancini, M. E., Berg, R. A., Nichol, G., és Lane-Trullt, T. (2003). Cardiopulmonary resuscitation of adults in the hospital: a report of 14720 cardiac arrests from the National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation. *Resuscitation* 58, 297-308.
- Perez-Pinzon, M. A. (2004). Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia. *J Bioenerg Biomembr* 36, 323-327.
- Pignataro, G., Meller, R., Inoue, K., Ordonez, A. N., Ashley, M. D., Xiong, Z., Gala, R., és Simon, R. P. (2008). In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 232-241.
- Plesnila, N., Friedrich, D., Eriskat, J., Baethmann, A., és Stoffel, M. (2003). Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci Lett* 345, 85-88.
- Pokorny, J., Trojan, S., és Fischer, J. (1982). Changes in the structure of the rat hippocampus after prolonged postnatal hypoxia. *Physiol Bohemoslov* 31, 193-202.
- Pulsinelli, W. A., Levy, D. E., és Duffy, T. E. (1982). Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11, 499-502.
- Pulsinelli, W. A., Levy, D. E., és Duffy, T. E. (1983). Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke* 14, 832-834.
- Rees, S., Breen, S., Loeliger, M., McCrabb, G., és Harding, R. (1999). Hypoxemia near mid-gestation has long-term effects on fetal brain development. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 932-945.
- Rehni, A. K., és Singh, N. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. *Pharmacol Rep* 59, 192-198.
- Ren, C., Gao, X., Niu, G., Yan, Z., Chen, X., és Zhao, H. (2008). Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS One* 3, e3851.
- Rice, F. L. (1993). Structure, vascularization, and innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by the lectin *Griffonia simplicifolia*. *J Comp Neurol* 337, 386-399.
- Rice, F. L., Kinnman, E., Aldskogius, H., Johansson, O., és Arvidsson, J. (1993). The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP 9.5 immunofluorescence. *J Comp Neurol* 337, 366-385.

- Rice, F. L., Mance, A., és Munger, B. L. (1986). A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J Comp Neurol* 252, 154-174.
- Risher, W. C., Ard, D., Yuan, J., és Kirov, S. A. (2010). Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra. *J Neurosci* 30, 9859-9868.
- Rodriguez-Moreno, A., Lopez-Garcia, J. C., és Lerma, J. (2000). Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1293-1298.
- Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., és *mtsai*. (2007). Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 115, e69-171.
- Rose, G. M., és Dunwiddie, T. V. (1986). Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation. *Neurosci Lett* 69, 244-248.
- Rosenblum, W. I., és El-Sabban, F. (1977). Effects of combined parenchymal and vascular injury on platelet aggregation in pial arterioles of living mice: evidence for release of aggregate-inhibiting materials. *Stroke* 8, 691-693.
- Rossen, R., Kabat, H., és Anderson, J. (1943). Acute arrest of cerebral circulation. *Arch Neurol Psychiatry* 50, 510-528.
- Rozanowska, M., Sarna, T., Land, E. J., és Truscott, T. G. (1999). Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med* 26, 518-525.
- Rozas, J. L., Paternain, A. V., és Lerma, J. (2003). Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* 39, 543-553.
- Rudolphi, K. A., és Schubert, P. (1997). Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia. *Behav Brain Res* 83, 123-128.
- Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernandez, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdan, S., Bogonez, E., és Satrustegui, J. (1998). Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* 9, 1277-1282.
- Rusakov, D. A., és Kullmann, D. M. (1998). Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci* 18, 3158-3170.
- Ryugo, D. K., Ryugo, R., Globus, A., és Killackey, H. P. (1975). Increased spine density in auditory cortex following visual or somatic deafferentation. *Brain Res* 90, 143-146.
- Sarti, C., Pantoni, L., Bartolini, L., és Inzitari, D. (2002). Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci* 203-204, 263-266.
- Sas, K., Robotka, H., Rozsa, E., Agoston, M., Szenasi, G., Gigler, G., Marosi, M., Kis, Z., Farkas, T., Vecsei, L., és Toldi, J. (2008). Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 32, 302-308.
- Sauerbeck, L. R. (2006). Primary stroke prevention. *Am J Nurs* 106, 40-41, 43-45, 48-49; quiz 49-50.
- Saver, J. L. (2006). Time is brain--quantified. *Stroke* 37, 263-266.
- Savtchenko, L. P., és Rusakov, D. A. (2004). Glutamate escape from a tortuous synaptic cleft of the hippocampal mossy fibre synapse. *Neurochem Int* 45, 479-484.
- Savtchenko, L. P., és Rusakov, D. A. (2005). Extracellular diffusivity determines contribution of high-versus low-affinity receptors to neural signaling. *Neuroimage* 25, 101-111.

- Sawe, N., Steinberg, G., és Zhao, H. (2008). Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res* 86, 1659-1669.
- Scartabelli, T., Gerace, E., Landucci, E., Moroni, F., és Pellegrini-Giampietro, D. E. (2008). Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology* 55, 509-516.
- Scheller, D., Szathmary, S., Kolb, J., és Tegtmeier, F. (2000). Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression, during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct. *Amino Acids* 19, 571-583.
- Schmued, L. C., és Hopkins, K. J. (2000a). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874, 123-130.
- Schmued, L. C., és Hopkins, K. J. (2000b). Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol Pathol* 28, 91-99.
- Schmued, L. C., Stowers, C. C., Scallet, A. C., és Xu, L. (2005). Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035, 24-31.
- Segal, M. B., Preston, J. E., Collis, C. S., és Zlokovic, B. V. (1990). Kinetics and Na independence of amino acid uptake by blood side of perfused sheep choroid plexus. *Am J Physiol* 258, F1288-1294.
- Sekhon, L. H., Morgan, M. K., Spence, I., és Weber, N. C. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion: pathological and behavioral consequences. *Neurosurgery* 40, 548-556.
- Sershen, H., és Lajtha, A. (1976). Capillary transport of amino acids in the developing brain. *Exp Neurol* 53, 465-474.
- Sewell, W. H., Koth, D. R., és Huggins, C. E. (1955). Ventricular fibrillation in dogs after sudden return of flow to the coronary artery. *Surgery* 38, 1050-1053.
- Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., Warnock, M., Homeister, J. W., Srikanth, S., Krijanovski, Y., Murphey, L. J., Jaffa, A. A., és Schmaier, A. H. (2006). Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. *Blood* 108, 192-199.
- Shimazaki, K., Ishida, A., és Kawai, N. (1994). Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res* 20, 95-99.
- Shimohata, T., Zhao, H., és Steinberg, G. K. (2007a). Epsilon PKC may contribute to the protective effect of hypothermia in a rat focal cerebral ischemia model. *Stroke* 38, 375-380.
- Shimohata, T., Zhao, H., Sung, J. H., Sun, G., Mochly-Rosen, D., és Steinberg, G. K. (2007b). Suppression of deltaPKC activation after focal cerebral ischemia contributes to the protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1463-1475.
- Shinozaki, H., és Konishi, S. (1970). Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res* 24, 368-371.
- Shors, T. J., és Matzel, L. D. (1997). Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav Brain Sci* 20, 597-614; discussion 614-555.
- Simons, D. J. (1983). Multi-whisker stimulation and its effects on vibrissa units in rat SmI barrel cortex. *Brain Res* 276, 178-182.
- Sorra, K. E., és Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10, 501-511.

- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Kish, S. J., Seitelberger, F., és Hornykiewicz, O. (1983). Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 10, 1301-1315.
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Seitelberger, F., és Hornykiewicz, O. (1985). Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res* 338, 289-295.
- Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T. T., L'Huillier, I., Aupetit, J. F., Bonnefoy, E., Finet, G., Andre-Fouet, X., és Ovize, M. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation* 112, 2143-2148.
- Stieg, P. E., Sathi, S., Warach, S., Le, D. A., és Lipton, S. A. (1999). Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur J Pharmacol* 375, 115-120.
- Stone, T. W. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45, 309-379.
- Storey, E., Kowall, N. W., Finn, S. F., Mazurek, M. F., és Beal, M. F. (1992). The cortical lesion of Huntington's disease: further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex. *Ann Neurol* 32, 526-534.
- Sudlow, C. L., és Warlow, C. P. (1997). Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration. *Stroke* 28, 491-499.
- Sutula, T., Lauersdorf, S., Lynch, M., Jurgella, C., és Woodard, A. (1995). Deficits in radial arm maze performance in kindled rats: evidence for long-lasting memory dysfunction induced by repeated brief seizures. *J Neurosci* 15, 8295-8301.
- Suzuki, H., Nagashima, T., Tamaki, N., és Yamadori, T. (1998). Cerebral ischemia affects glucose transporter kinetics across rat brain microvascular endothelium: quantitative analysis by an in situ brain perfusion method. *Surg Neurol* 49, 67-76.
- Tanaka, H., Yokota, H., Jover, T., Cappuccio, I., Calderone, A., Simionescu, M., Bennett, M. V., és Zukin, R. S. (2004). Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci* 24, 2750-2759.
- Tashiro, A., Dunaevsky, A., Blazeski, R., Mason, C. A., és Yuste, R. (2003). Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* 38, 773-784.
- Taylor, T. N., Davis, P. H., Torner, J. C., Holmes, J., Meyer, J. W., és Jacobson, M. F. (1996). Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke* 27, 1459-1466.
- Teichberg, V. I., Cohen-Kashi-Malina, K., Cooper, I., és Zlotnik, A. (2008). Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* (in press).
- Teichberg, V. I., Cohen-Kashi-Malina, K., Cooper, I., és Zlotnik, A. (2009). Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 158, 301-308.
- Traystman, R. J., Kirsch, J. R., és Koehler, R. C. (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71, 1185-1195.
- Tsang, A., Hausenloy, D. J., és Yellon, D. M. (2005). Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2-7.
- Tsuchiya, M., Sako, K., Yura, S., és Yonemasu, Y. (1992). Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res* 89, 87-92.

- Tsuchiya, M., Sako, K., Yura, S., és Yonemasu, Y. (1993). Local cerebral glucose utilisation following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: relation to changes in local cerebral blood flow. *Exp Brain Res* 95, 1-7.
- Umemura, K., Shimakura, A., és Nakashima, M. (1997). Neuroprotective effect of a novel AMPA receptor antagonist, YM90K, in rat focal cerebral ischaemia. *Brain Res* 773, 61-65.
- van Alem, A. P., de Vos, R., Schmand, B., és Koster, R. W. (2004). Cognitive impairment in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Am Heart J* 148, 416-421.
- Van Der Loos, H. (1976). Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 2, 1-6.
- Vesce, S., Rossi, D., Brambilla, L., és Volterra, A. (2007). Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82, 57-71.
- Vesikansa, A., Sallert, M., Taira, T., és Lauri, S. E. (2007). Activation of kainate receptors controls the number of functional glutamatergic synapses in the area CA1 of rat hippocampus. *J Physiol* 583, 145-157.
- Vespa, P., Prins, M., Ronne-Engstrom, E., Caron, M., Shalmon, E., Hovda, D. A., Martin, N. A., és Becker, D. P. (1998). Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study. *J Neurosurg* 89, 971-982.
- Vignes, M., Clarke, V. R., Parry, M. J., Bleakman, D., Lodge, D., Ornstein, P. L., és Collingridge, G. L. (1998). The GluR5 subtype of kainate receptor regulates excitatory synaptic transmission in areas CA1 and CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 37, 1269-1277.
- Villa, P., van Beek, J., Larsen, A. K., Gerwien, J., Christensen, S., Cerami, A., Brines, M., Leist, M., Ghezzi, P., és Torup, L. (2007). Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 552-563.
- Vinten-Johansen, J., Zhao, Z. Q., Zatta, A. J., Kin, H., Halkos, M. E., és Kerendi, F. (2005). Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 100, 295-310.
- Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., és Kimura, J. (1994). Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 87, 484-492.
- Wang, J. Y., Shen, J., Gao, Q., Ye, Z. G., Yang, S. Y., Liang, H. W., Bruce, I. C., Luo, B. Y., és Xia, Q. (2008). Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke* 39, 983-990.
- Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., és Ginsberg, M. D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17, 497-504.
- Wei, H., Liang, G., és Yang, H. (2007). Isoflurane preconditioning inhibited isoflurane-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 425, 59-62.
- Welker, C. (1971). Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26, 259-275.
- Welker, E., Hoogland, P. V., és Van der Loos, H. (1988). Organization of feedback and feedforward projections of the barrel cortex: a PHA-L study in the mouse. *Exp Brain Res* 73, 411-435.
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O'Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., Rafols, J. A., és Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179, 1-33.

- Wright, A., Hawkins, C. L., és Davies, M. J. (2003). Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. *Free Radic Biol Med* 34, 637-647.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., és Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Xing, B., Chen, H., Zhang, M., Zhao, D., Jiang, R., Liu, X., és Zhang, S. (2008). Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* 39, 2362-2369.
- Xue, D., Huang, Z. G., Smith, K. E., és Buchan, A. M. (1992). Immediate or delayed mild hypothermia prevents focal cerebral infarction. *Brain Res* 587, 66-72.
- Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273-295.
- Yano, K., Hosokawa, K., és Hata, Y. (1997). Quantitative morphology of Auerbach's plexus in rat intestinal wall undergoing ischemia. *J Reconstr Microsurg* 13, 297-301.
- Yoshida, F., Sadoshima, S., Fujii, K., Iino, K., és Fujishima, M. (1988). Regional cerebral blood flow in chronic stroke patients with dementia. *Jpn J Med* 27, 172-176.
- Yuste, R., és Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684.
- Zador, Z., Benyo, Z., Lacza, Z., Hortobágyi, T., Harkány, T., és Hortobágyi, T. (2004). Neuroprotection in brain ischemia - doubts and hopes. *Clin Neurosci* 57, 81-93.
- Zádor, Z., Lacza, Z., Benyó, Z., Harkány, T., és Hortobágyi, T. (2003). Apoptosis in focal brain ischaemia. *Clin Neurosci* 56, 216-228.
- Zauner, A., Bullock, R., Kuta, A. J., Woodward, J., és Young, H. F. (1996). Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl* 67, 40-44.
- Zhang, X., Qiu, M., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., és Kang, D. (1998). Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid and their relations with clinical features and outcomes in acute head injury. *Chin Med J (Engl)* 111, 978-981.
- Zhao, H. (2007). The protective effect of ischemic postconditioning against ischemic injury: from the heart to the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2, 313-318.
- Zhao, H. (2009). Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 873-885.
- Zhao, H., Sapolsky, R. M., és Steinberg, G. K. (2006). Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1114-1121.
- Zhao, H., Shimohata, T., Wang, J. Q., Sun, G., Schaal, D. W., Sapolsky, R. M., és Steinberg, G. K. (2005). Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25, 9794-9806.
- Zhao, H., Yenari, M. A., Cheng, D., Sapolsky, R. M., és Steinberg, G. K. (2003). Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem* 85, 1026-1036.
- Zhao, Z. Q., és Vinten-Johansen, J. (2006). Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res* 70, 200-211.
- Zlokovic, B. V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28, 202-208.
- Zlotnik, A., Gurevich, B., Cherniavsky, E., Tkachov, S., Matuzani-Ruban, A., Leon, A., Shapira, Y., és Teichberg, V. I. (2008). The contribution of the blood glutamate scavenging activity of pyruvate to its neuroprotective properties in a rat model of closed head injury. *Neurochem Res* 33, 1044-1050.

Zlotnik, A., Gurevich, B., Tkachov, S., Maoz, I., Shapira, Y., és Teichberg, V. I. (2007).
Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp Neurol* 203, 213-220.

Tudományos közlemények jegyzéke

Cikkek

***Cellular and Molecular Neurobiology* (2010) 7:1101-1106. (Impact faktor: 2,483)**
Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials
Nagy D, Knapp L, Marosi M, Farkas T, Kis Z, Vécsei L, Teichberg VI, Toldi J.

***Journal of Neural Transmission* (2010) 117:183–188. (Impact faktor: 2,67)**
A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study
Marosi M, Nagy D, Farkas T, Kis Z, Rózsa E, Robotka H, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J.

***Cellular and Molecular Neurobiology* (2009) Sep;29(6-7):827-35. (Impact faktor: 2,483)**
Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex
Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Rakos G, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J.

***European Journal of Pharmacology* (2009) Feb 14;604(1-3):51-7. (Impact faktor:2,376)**
Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion
Marosi M, Fuzik J, Nagy D, Rákos G, Kis Z, Vécsei L, Toldi J, Ruban-Matuzani A, Teichberg VI, Farkas T.

***Brain Research Bulletin* 2007; 76 (2008) 474–479. (Impact faktor: 2,184)**
The pentylenetetrazole-induced activity in the hippocampus can be inhibited by the conversion of L-kynurenine to kynurenic acid. An in vitro study
Eva Rozsa; Hermina Robotka; David Nagy; Tamas Farkas; Katalin Sas; Laszlo Vecsei; Jozsef Toldi

***Acta Neurobiologiae Experimentalis* (2007);67(2):149-54. (Impact faktor: 1,337)**
Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain
Rákos G, Kis Z, Nagy D, Lür G, Farkas T, Hortobágyi T, Vécsei L, Toldi J.

Poszterek

IBRO International Workshop; Pécs, (2010)

Kainate Postconditioning Protects Against Neuronal Dysfunction after Global Hypoperfusion in Rat Hippocampus

D. Nagy, M. Marosi, J. Fuzik, K. Kocsis, P. Antal, L. Knapp, T. Farkas, Zs. Kis, J. Toldi

6th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology

Poszter 4.

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

Marosi M., Fuzik J., Nagy D., Rákos G., Kis Z., Farkas T., Teichberg V.I. and Toldi J.

Poszter 5.

Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischaemia in rat cortex

D. Nagy, M. Marosi, Zs. Kis, T. Farkas, G. Rakos, L. Vecsei, V.I. Teichberg, J. Toldi

IBRO International Workshop: Complex Neuronal Networks, Debrecen, Magyarország, (2008)

Poszter 144

Oxaloacetate is efficient in recovering ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region

Marosi M., Fuzik J., Nagy D., Rakos G., Kis Zs., Farkas T. and Toldi J.

LXX. Congress of Hungarian Physiological Society (2006)

Poszter szekció: nervous system P17

Effects of oxaloacetate on the evoked responses in the primary somatosensory cortex of rats

Dávid Nagy, György Lür, Máté Marosi, Vivian I. Teichberg, József Toldi

IBRO Regulatory mechanisms of synaptic transmission in the central nervous system (2006)

Poszter szekció II. 157.

Fundamental differences in the acute but not in chronic ischemic tolerance of hippocampal CA1 region between wistar rats from different vendors

Máté Marosi, Gabriella Rákos, Hermina Robotka, Hajnalka Németh, Katalin Sas, Dávid Nagy, György Lür, Zsolt Kis, Farkas Tamás, László Vécsei and József Toldi

Poszter szekció II. 115.

Effects of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on the evoked cortical activity of controls and of brain-injured rats

Lür, György; Rákos, Gabriella; Marosi, Máté; Nagy, Dávid; Farkas, Tamás; Kis, Zsolt; Toldi, József

5th Forum of European Neuroscience (2006)

Poszter szekció A237.24.

Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia.

Máté Marosi, Gabriella Rákos, Hermina Robotka, Hajnalka Németh, Katalin Sas, Dávid Nagy, György Lür, Zsolt Kis, Farkas Tamás, László Vécsei and József Toldi

Mellékletek
