

KOLESZTERIN DIÉTA INDUKÁLTA VÁLTOZÁSOK
HÁZINYÚL AGYI KAPILLÁRISAIBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette: PATAKI MÁRIA

biológus

Készült: A Bács-Kiskun megyei Tanács

"Hollós József"

Kórház - Rendelőintézet

Patológiai Osztályán



és a

MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézetének Neurobiológiai Csoportjában

KECSKEMÉT

1990

TARTALOMJEGYZÉK

I.1.	Bevezetés (a téma indoklása, célkitűzések).....	1
I.2.	Irodalmi áttekintés.....	3
I.2.1.	Az ateroszklerózisról általában.....	3
I.2.2.	Agyi érkatasztrófák (stroke).....	10
I.2.3.	Ismereteink a vér-agy gátról.....	17
I.2.4.	A nyúl, mint az ateroszklerózis kutatás mo- dellje.....	23
II.	Vizsgálati anyagok és módszerek.....	25
II. 1.	Koleszterin-szklerózis.....	25
II. 2.	Szérum összkoleszterin meghatározása.....	25
II. 3.	Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgá- latok.....	25
II. 4.	Kis sűrűségű lipoprotein (LDL) izolálása nyúlszérumból.....	26
II. 5.	Agaróz gélelektroforézis.....	27
II. 6.	Fehérjetartalom meghatározása.....	27
II. 7.	Kolloidális aranyoldat készítése.....	27
II. 8.	LDL jelölése kolloidális arannyal.....	27
II. 9.	Marha szérum albumin (BSA) jelölése kolloi- dális arannyal.....	28
II.10.	Permeabilitásvizsgálat Evans késsel.....	28
II.11.	Nyúl szérum-albumin immunhisztokémiai kimu- tatása.....	28
II.12.	Túlélő agykapilláris preparátum készítése in vitro kísérletekhez.....	29
II.13.	Agykapilláris preparátum vitalitásának vizs- gálata.....	29

II.14.	Agykapilláris preparátum készítése bioké- miai vizsgálatokhoz.....	29
II.15.	Adenilcikláz enzimaktivitás mérése agykapil- láris preparátumban.....	30
II.16.	Na ⁺ , K ⁺ - ATPáz enzimaktivitás mérése agykapilláris preparátumban.....	30
II.17.	Agykéreg K ⁺ és Na ⁺ tartalmának meghatá- rozása atomabszorpciós módszerrel.....	31
II.18.	Fibroblaszt sejtek izolálása nyúlfülből.....	31
II.19.	In vitro kísérletek fibroblaszt sejttenyé- szeten.....	31
II.20.	Vérnyomásmérés véres úton.....	31
II.21.	Arteria carotis communis és vena jugularis preparálása.....	31
II.22.	Perfúzió.....	32
II.23.	Agy sűrűségének meghatározása Percoll grá- diensen.....	32
II.24.	Agy víztartalmának meghatározása a klasszi- kus nedves/száraz módszerrel.....	32
II.25.	Szérum ozmolaritás mérése.....	33
II.26.	Agykapilláris-plazmamembrán zsírtartalmának és zsírsav összetételének mérése.....	33
III.	Eredmények.....	34
III.1.	Szérum lipid vizsgálatok.....	34
III.2.	Morfológiai változások az aortában és más szervek kisebb artériáiban.....	34

III.3.	Morfológiai változások az agykérgi kapillárisokban.....	34
III.4.	LDL izolálás nyúlszérumból.....	36
III.5.	LDL felvétel vizsgálata.....	36
III.5.1.	LDL felvétel vizsgálata izolált agykapilláris frakción.....	36
III.5.2.	In situ perfúzió arany jelzett LDL-vel.....	37
III.5.3.	LDL felvétel vizsgálata fibroblaszt sejtenyészetén.....	38
III.6.	Albumin permeabilitás vizsgálata.....	39
III.6.1.	Arany jelzett albuminnal.....	39
III.6.2.	Evans késsel (EK).....	39
III.6.3.	Immunhisztokémiai módszerrel.....	40
III.7.	Víztartalom mérések.....	40
III.8.	Agysűrűség meghatározása.....	42
III.9.	Szérum ozmolaritás mérése.....	43
III.10.	Az agy Na^+ és K^+ tartalmának mérése.....	44
III.11.	Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitás.....	45
III.12.	Adenilcikláz (AC) aktivitás.....	45
III.13.	Koleszterin/foszfolipid (CH/PL) moláris arány a sejtmembránban.....	46
IV.	Megbeszélés.....	47
IV.1.	Összefoglalás.....	59
V.	Függelék.....	60
VI.	Irodalom.....	85
VII.	Köszönetnyilvánítás.....	105

I.1. Bevezetés

Az érelmeszesedéssel foglalkozó, és szinte követhetetlen mennyiségű irodalomban nagyon kevés olyan dolgozatot találunk, amely az agyi kapillárisok viselkedésével, a vér-agy gát működésével foglalkozna. Pedig az agyi mikroérrendszernek igen nagy jelentősége van a szöveti keringésben, a tápanyagok és az oxigén szállításában.

Munkánk célja volt adatokat gyűjteni arra vonatkozólag, hogy házinyúlban a kísérletesen, koleszterinnel létrehozott érelmeszesedés során az agyban milyen morfológiai és biokémiai elváltozások jönnek létre. A koleszterin etetéssel létrehozott érelmeszesedés modell esetében az aortában, valamint a közép és kis artériákban /2.,3.,4. képek/ kialakul a betegség, míg az a. carotisban, ill. az intrakraniális artériákban nem jönnek létre elváltozások. Kísérleteink során arra kerestünk választ, hogy a koleszterinnel etetett állatokban megnövekszik-e a vér-agy gát permeabilitása kis sűrűségű lipoproteinekre /LDL/, vagy sem.

A nagyerekben ugyanis a betegség progressziójával együttjár az LDL felvétel növekedése. Mivel tapasztalataink szerint a lipoprotein felvétel nem változott a koleszterin etetés hatására, ill. olyan kismértékű volt, hogy az alkalmazott módszerekkel nem tudtuk kimutatni, az ultrastrukturális elváltozásokra igyekeztünk magyarázatot találni. Az elektronmikroszkópos felvételeken látható citotoxikus ödéma létrejöttének esetleges magyarázatára mértük az agy víztartalmát, a kapillárisok adenilcikláz és Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitását, valamint a plazmamembrán koleszterin és foszfolipid tartalmát.

A fenti paraméterek eltérései, valamint az irodalmi adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a kiváltó ok a hipoxia, amelyet elsősorban a magas szérum-koleszterinszint idéz elő.

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a magas szérum-koleszterinszint kismértékű elváltozások sorozatát hozhatja létre, amelyek a vér-agy gát működésében nem okoznak durva elváltozásokat, azonban jelentősen befolyásolhatják az agy működését, homeosztázisát.

I.2. Irodalmi áttekintés

I.2.1. Az ateroszklerózisról általában

Az ateroszklerózis az arteriális rendszer generalizált betegsége, amely lassan fejlődik és tünetmentes mindaddig, amíg a léziók elég nagyokká és összetettekké nem válnak, hogy isémiát okozzanak. Gyerekkorban és tizenéves korban is zsírfoltok /fatty streak/ fedhetik az arteriális belfelület 10-50 %-át, azonban ezeket a reverzibilis, zselatinos léziókat önmagukban veszélyteleneknek tartják. Körülbelül 30 éves kortól azonban már proliferatív léziók jelennek meg. Még jelentős térkitöltő léziók esetében is /40-70 % szűkület/ a betegség rendszerint tünetmentes, az EKG normális. Az érfal jelentős szűkületénél /70-90 %/ azonban már klinikai manifesztációk jelennek meg /angina/, súlyosabb esetben infarktus, stroke és gangréna fejlődik ki /Comai és mtsai, 1985./. Az elmúlt években számos tanulmány hívta fel a figyelmet a szérum koleszterinszint jelentőségére az aterogenezisben /Duffield és mtsai, 1983., Nikkila és mtsai, 1983., Arntzenius és mtsai, 1983., NHLBI, 1983., LRCF, 1984./. A szívroham rizikója fokozódik a szérum koleszterin szintjének emelkedésével /Dawber, 1980./ és ez a fokozódás drámai, ha a szérum koleszterinszint meghaladja az 5,2 mmol/l-s koncentrációt. Az USA-ban a férfiak átlagos szérum koleszterinszintje kb. 5,4 mmol/l. Több, mint 500.000-en halnak meg szív-érrendszeri megbetegedésekben, több, mint 600.000 embert ápolnak kórházakban miokardiális infarktussal és több, mint 5 millió embernél diagnosztizálnak szív-érrendszeri megbetegedést évente. A 6 évvel ezelőtt megjelent Lipid Research Clinics tanulmány /LRCF, 1984./ kimutatta, hogy az LDL-koleszterin csökkenése a szív-érrendszeri megbetegedések csökkenéséhez vezet. Az LDL-koleszterin mérsékelt, már 10 %-os csökkenése is a szív-érrendszeri megbetegedések 18 %-os csökkenéséhez vezet.

A megfelelő táplálkozás, a kívánatos testsúly fenntartása és a rendszeres testedzés a legjótékonyabb hatásúak a szérum lipidek normalizálása és az egészséges szív-érrendszer megőrzése érdekében /Herbert és Terpstra, 1984./ A kardiopulmonáris és szív-érrendszeri megbetegedések a dohányzás mérséklésével is csökkenthetők lennének /Comai, 1985./ Az ateroszklerózis patomechanizmusának kutatására különböző állatmodellek szolgálnak. A sokféle diétás módszer közül a koleszterin tartalmúak etetése terjedt el legjobban, ui. nemcsak a szérum koleszterinszint jelentős emelkedése érhető így el, hanem ezt az érfal morfológiai elváltozásai is követik. A koleszterin etetés eredményeiről elsőként Anitschkow számolt be a század elején /Anitschkow, 1912, 1913./. Duff már 1935-ben felhívta a figyelmet a mononukleáris fagociták jelentőségére az ateroszklerózisban. Az ateroszklerózis és a gyulladás közötti kapcsolatot világítja meg az az érdekes közlemény, melyet Duff és munkatársai írtak 1957-ben. Hiperkoleszterinémiás nyulakban vizsgálták a legkorábbi ateroszklerotikus léziókat, melyekre két lényeges dolog jellemző: 1. lipidcseppek jelenléte az intimális és szubintimális sejtekben, valamint 2. mononukleáris sejtek /makrofágok, vagy limfociták/ helyenkénti megjelenése az intimában. Trombuszt sohasem találtak. Később a simaizomsejtek /SIS/ kerültek az érdeklődés középpontjába /Haust és mtsai, 1960, Geer és mtsai, 1972./. Felfedezték a vérlemezke-eredetű növekedési faktort /PDGF/ /Ross és mtsai, 1974./, amellyel SIS-proliferációt tudtak indukálni in vitro. Abból a tényből, hogy a plakkokban nagyszámú SIS található, valamint a PDGF jelenlétéből arra következtettek, hogy a plakkok kialakulásához a vérlemezke faktor jelentősen hozzájárul. Azonban a vérlemezkékből normál esetben nem szabadul fel ez a faktor, csak ha stimulálják őket, mint pl. a trombusokban.

A trombus képződésének feltételei az artériában: az endotélium sérülése, ill. elvesztése, és így a véralkotók szabad érintkezése a trombogén szubendotéliummal. Így született Ross és munkatársainak "endotél sértés" hipotézise, amely nagyon gyorsan népszerűvé vált /Ross, 1981./.

Az elmélet szerint a sérült, vagy hiányzó endotélium helyén vérlemezketroombus képződik, majd a felszabaduló PDGF plakk képződéshez vezet. A teória egyetlen hibája az volt, hogy emberben és kísérletes ateroszklerózisban sohasem figyelhető meg ez a kezdeti endotélvesztés.

Az első lépés nem az endotélium eltűnése, hanem inkább a mononukleáris sejtek kitapadása az endotéliumhoz, melyet azok érfalba való bevándorlása követ. Ezt Gerrity sértésben mutatta ki /1981/, Lewis és munkatársai galambon /1982/, Ross és munkatársai, valamint Faggiotto és munkatársai majmon /1981, 1982, 1984/, Joris és munkatársai patkányon /1983/ és humán koronáriákon /1984/.

Az intimába bejutó sejtek egy része - patkány modell esetében kb. 10 % - limfocita. Humán léziókban ugyancsak található limfociták. Csábító az a gondolat, miszerint a limfociták uralkodó sejtként viselkednének, irányítva környezetükben a sejt eseményeket limfokin-szekréciónjuk által /Majno, 1985./. Ezt az elképzelést a további kutatások fogják igazolni, vagy elvetni. Aqel és munkatársai /1984/ immunhisztokémiai módszerekkel bizonyították, hogy az ateroszklerotikus plakkokat alkotó habossejtek jelentős része monocita eredetű makrofág sejt. Az utóbbi időben egyre jobban sikerült megérteni a makrofágok sejtbiológiáját /Nathan és mtsai, 1980./. Ezeknek a sejteknek sokféle funkciója van, melyek közül szekrécións_képességeik látszanak a legfontosabbnak-az-aterogenezisben. A különböző neutrális és savas proteázoknak, melyek a fejlődő ateroszklerotikus léziókban a makrofágokból

szabadulnak fel, kétségtelenül károsító hatásuk van az artériák szerkezetét felépítő elasztinra és kollagénnre. 2

Egy makrofágok által szekretált növekedési faktor (MDGF) stimulálja a tenyésztett SIS-k proliferációját /Greenburg és Hunt, 1978./. Ily módon a makrofágok szekréciós termékei képesek szövetkárosodást és sejtproliferációt okozni, melyek az ateroszklerotikus léziók fontos jellemzői. Feltételezik, hogy a monociták és makrofágok fontos szerepet játszanak az érfal lipoprotein anyagcseréjében. A monociták receptorokkal rendelkeznek a natív és acetilált-LDL-re, míg a makrofágoknak az acetilált LDL-re van receptoruk és nincs, vagy csak kevés van natív LDL-re /Brown és Goldstein, 1983./. Fenti eredmények azért jelentősek, mert a makrofágok acetilált LDL receptora képes megkötni azt az LDL-t, melyet a tenyésztett aorta endotélsejtek, vagy SIS-k kémiaailag módosítottak /Henriksen és mtsai, 1981./, illetve azt az in vivo módosult LDL frakciót, melyet nemrégén Avogaro és mtsai /1988/ izoláltak humán szérumból. A kísérletes hiperlipémia korai állapotában a keringő monociták kitapadnak az érfal endotéliumához, bejutnak az endotéljunktciók között, és az intimában megemésztik a lipideket. A habossejt léziók sorsa ma még csak részben ismert. Lipidekkel telt habossejteket figyeltek meg hiperlipémiás disznóban /Gerrity, 1981. b./ és majmokban /Faggiotto és Ross, 1984./, melyek éppen elhagyták a léziókat, keresztülnyomulva az endotéliumon a lumen felé. Ezek az eredmények vezettek ahhoz az elképzeléshez, miszerint a monociták az érfal lipid eltávolító rendszereként funkcionálnak /Gerrity, 1981. b./. Palade javasolt egy koncepciót 1953-ban, miszerint bizonyos molekulákat vezikulák szállítanának az endotél-

sejt egyik oldaláról a másikra, amely ma már nem koncepció, hanem tény. Néhány évvel ezelőtt Simionescu a találó transzcitózis nevet adta neki /1981./. Az utóbbi tíz évben ez a kutatási irányzat találkozott Goldstein és Brown alapvető munkáival /1979/, akik a lipoprotein anyagcsere új aspektusait vizsgálták, a lipoprotein receptorok szerepét különböző sejttípusokon. A transzcitózis, a lipoprotein receptorok és az ateroszklerózis közötti kölcsönhatást csak mostanában kezdik felderíteni. Kétségtelen, hogy a transzcitózis magyarázhatja a gyakran előforduló lipidcseppeket az intimális és mediális SIS-kben; vagy a szabadon elhelyezkedő koleszterin szemcséket az intimális extracelluláris térben a folyamatos endotélréteg alatt. Goldstein és Brown kb. egyévtizedes munkája jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy jobban megértsük a koleszterin anyagcsere exogén és endogén útjait, és annak okait, hogy némely emberben (familiáris hiperkoleszterinémia) időelőtti koszorúsér-megbetegedés fejlődik ki. Exogén anyagcsereút alatt értjük, amikor a táplálékkal bekerülő koleszterin a belekben felszívódik és kilomikronokban transzportálódik. A lipoprotein lipáz, mely az erek endotél felszínén található enzim, hidrolizálja a kilomikronok trigliceridjét, koleszterinben gazdag kilomikron maradványt (remnant) képezve. Ezeket a maradvány molekulákat a máj távolítja el egy remnant receptor-mechanizmus segítségével. Endogén anyagcsereút esetén a máj-koleszterin trigliceridben gazdag VLDL részecskébe kerül. A lipoprotein lipáz ismét eltávolít valamennyi trigliceridet és átalakítja a VLDL molekulát egy közti sűrűségű lipoprotein részecskévé /IDL/. Az IDL részecskék egy részét felveszi a máj az LDL receptorain keresztül, míg a másik része LDL-é metabolizálódik.

A koleszterinben gazdag LDL részecskéket elsősorban a máj távolítja el az LDL-receptorokon keresztül. A szérum-koleszterin kb. 65 %-ának eltávolításáért felelős ez az LDL-receptor anyagcsereút. A receptorok és a koleszterin szintézis összehangoltan működnek. Az LDL receptor az endoplazmás retikulumban szintetizálódik és a Golgi apparátusban készül el véglegesen /Brown és Goldstein, 1984./ Az újonnan szintetizált receptor a sejtfelületre transzportálódik. Miután kölcsönhatásba kerül az LDL molekulával, az LDL receptor komplex egy burkos receptorcsapdába /coated pit/ vándorol. Amikor már kellő számú receptor lépett a burkos receptorcsapda területére, akkor az a citoplazmába tűródik; ez a folyamat körülbelül egy percet vesz igénybe. Amint a sejt belsejébe került a vezikula, majdnem azonnal leveti burkát, szabaddá téve ezzel a klatrint a további endocitotikus körfolyamatokhoz. Ezután a burok nélküli vezikula összeolvad egy endoszómának nevezett sejtszervecskével. Az endoszóma savas körülményei között az LDL leszakad a receptorról, majd a receptor visszajut a felszínre, míg az LDL molekulát a lizoszómák dolgozzák fel. A lizoszómális enzimek hatására a polipoproteinekre és koleszterin-észterekre hidrolizálódik. A szabad koleszterin gátolja mind a HMG-CoA redukáz (hidroxil-metil-glutaril-koenzim A redukáz) a koleszterin bioszintézis sebességének meghatározó enzimét, mind az LDL-receptor szintézisét. A szabad koleszterint újraészterezzi az ACAT (acil-koenzim A: koleszterin aciltranszferáz), hogy koleszterin-észterként elraktározódjon. A májban a koleszterin epesavakká alakul, amely az epével a belekbe kerül, majd pedig a széklettel ürül ki.

Fentiek figyelembevételével érthető, hogy a familiáris hiperkoleszterinémiában, ahol nincs, vagy kevés LDL-receptor van, miért alakul ki a magas

szérum koleszterinszint, amely az LDL részecskék meghosszabbodott keringéséhez vezet és a koleszterin lerakódásához a szövetekben, különösen az artériákban /Goldstein és mtsai, 1983., Brown és Goldstein, 1984./. Az utóbbi időben egyre nő azoknak a közleményeknek a száma, melyek a szabadgyökök jelentőségére, veszélyességére hívják fel a figyelmet, többek között az ateroszklerózissal kapcsolatban is /Gey, 1986./. Humán ateroszklerotikus plakkban a lipidperoxidok és hidroperoxidok felhalmozódása pozitív összefüggésben van az ateroszklerózis mértékével /Goto, 1982., Glavind, 1952., Iwakami, 1965./.

A ceroid pigmentek /a lipidperoxidáció stabil végtermékei proteinnel összekapcsolódva/ az összes ateroszklerotikus plakkban, valamint makrofágszerű sejtekben /Mitchinson, 1985./ megtalálhatók. A peroxidokat tartalmazó diétát állatokban toxikusnak találták /Gabriel, 1979./, hirtelen halált okoztak, a szívizom degeneratív elváltozásaival /Thafvelin, 1960./.

Az arachidonsav és egyéb többször telítetlen zsírsavak (PUFA) peroxidjainak nagy volt a toxicitása parenterálisan /Cortesi, 1972./. Károsítják az endotéliumot és a szívizomsejteket, valamint a SIS-k proliferációját idézik elő /Bird, 1981., Yagi, 1982./. A plazma lipoproteinek közül az LDL a legérzékenyebb az autooxidációra /Szczeplik, 1980., 1981./, valamint erősen reaktív oxigéngyökök, pl. szuperoxid gyökök, vagy hidrogénperoxid általi denaturációra /Morel és mtsai, 1983./. A peroxidációval módosított LDL citotoxikus a tenyésztett endotélsejtekre és fibroblasztokra /Hinsbergh, 1984./. Sokan beszámoltak arról, hogy nem történik sejtmérgezés, amennyiben a peroxidok képződését antioxidánsokkal - mint pl. C és E vitaminok - kivédjük, amelyek valószínűleg megvédik a membrán-fosfolipidek PUFA-it /Evensen és mtsai, 1983.; Morel és mtsai, 1983./.

Endotélsejtek, SIS-k vagy vérlemezkék in vitro termelhetnek szabadgyököket és/vagy lipidperoxidációs termékeket (pl. MDA), melyek módosítják a foszfatidilkolint és a plazma LDL-jének B apoproteinjét. A lipidoldékony antioxidánsok, mint az E vitamin, gátolják az LDL-nek ezen módosulását /Steinbrecher és mtsai, 1984./. A hidroperoxiarachidonsav, a 15-HPETE /Bourgain, 1980., Moncada és mtsai, 1978./, valamint az LDL citotoxikus peroxidjai /Evensen és mtsai, 1983., Morel és mtsai, 1983./ a prosztaciklin /PGI₂/ képződés gátlását okozzák az artériákban, kísérletes ateroszklerózisban /Gryglewski és mtsai, 1978./ és humán ateroszklerotikus plakkokban /d'Angelo és mtsai, 1978./.

Saját eredményeink szerint az exogén PGI₂ i.v. adagolása jelentős védelmet nyújt az érfali plakkok kialakulásával szemben kísérletes ateroszklerózisban, házinyúlon /Makáry és mtsai, 1982., 1983., Pataki és mtsai, 1984./. Hasonló eredményeket kaptak patkány modellen Jellinek és munkatársai, Iloprost (stabil PGI₂ analóg) adagolása esetén /szóbeli közlés/. A PGI₂ citoprotektív és antihipoxiás hatásáról számolt be több kutatócsoport agyi isémiát követően, különböző kísérleti állatokon /Pluta és mtsai, 1985., Masuda és mtsai, 1986./. Payton és mtsai /1985/ drámai javulást írtak le PGI₂ infúziót követően trombotikus trombocitopéniás purpurában.

I.2.2. Agyi érkatasztrófák /stroke/

A "stroke", vagyis az agyi érkatasztrófák epidemiológiai tanulmányozása nem könnyű, mivel általában az élet későbbi szakaszában alakulnak ki, és előfordulásuk, valamint halálozási arányszámaik lényegesen alacsonyabbak /Shurtleff, 1974./, mint a szív-érrendszeri megbetegedésekéi.

Az Amerikai Szív-gyógyászati Társaság /American Heart Association/ 1977-es felmérése szerint kb. 1,8 millió volt a stroke-ban szenvedők száma az USA-ban, ami kb. a fele a szív-érrendszeri megbetegedéseknek. Előfordulási gyakoriságuk a korral nő. A stroke miatt munkaképtelen lakosság egyharmada 35-65 éves (USA), ami a megelőzés óriási jelentőségére hívja fel a figyelmet. Gondozásukra évente több, mint 3 billiárd dollárt költenek; az évenkénti új megbetegedések száma kb. 500.000 fő, főleg 55 éves kor feletti /Ross, 1983./. Európában az 50-60 év közötti népesség 25 %-a szenved kisebb-nagyobb mértékű érrelmeszesedésben. A 80-90. életév közötti embereknél ez az arány már 60-70 % /Antalóczy, 1984./. Hazánkban 1978-ban az összes halálozás 52,2 %-a volt keringési betegség következménye. A keringési rendszer betegségein belüli halálozás több, mint háromnegyed része isémiás szívbetegség, cerebrovaszkuláris betegségek és hipertónia következményei voltak. A férfiak halálozásában az isémiás szívbetegségek, különösen a szívinfarktus, a nők halálozásában az agyvérzés dominálnak /Jánosi és mtsai, 1983./. Ha ismét az Egyesült Államok adatait tekintjük, kitűnik, hogy a stroke előfordulása általában, az aterotrombotikus agyi infarktusok száma pedig kifejezetten a korral emelkednek mindkét nemből, de a nőknél sokkal meredekebben. Az ateroszklerotikus betegségekben 55 éves kor alatt a férfiak túlsúlya jellemző. Ha összehasonlítjuk az agyi és miokardiális infarktusokat a két nemből, a férfiak kifejezett túlsúlyát találjuk miokardiális infarktusban minden korosztály esetében /majdnem 4 miokardiális infarktus jut 1 agyi infarktusra férfiaknál/, míg a nőknél gyakorlatilag egyformán fordul elő mindkettő.

Nőknél a cerebrális ateroszklerózis súlyossága nem olyan nagyfokú, amíg a nők el nem veszítik premenopauzális immunitásukat az ateroszklerotikus érbetegségekkel szemben.

A stroke előfordulása általában késői életkorban jellemző ugyan, de 20 %-uk 65 év alatt következik be: pl. az USA-ban 1972-ben 45-54 éves korban 1 % , 55-64 éveseknél 3,5 % , illetve 65-74 éves korban 9 % volt. A trombotikus stroke-ok 18 %-a a karotisz atherotrombotikus betegségének következménye, 16 %-a a vertebrális és baziláris artériák megbetegedéséből származik, és 19 %-uk lakunáris infarktus. Az összes stroke 31 %-át embólia okozza, 10 %-át hipertenzió által kiváltott intrakraniális vérzés, ill. 6 %-át aneurizmaruptúra eredményeként létrejött vérzés hozza létre. A Framingham-féle tanulmány /1973/ 26 éven keresztül követte a különböző agyi érkatasztrófák előfordulását, melyből a 65-74 év közötti korcsoport adatai a következők:

	férfiak /%/	nők /%/
ABI ateroembóliás agyi infarktus	58	54
CE agyi embólus	16	19
ICH intracerebrális vérzés	5	3
SH szubarachnoidális vérzés	10	12
TIA átmeneti isémiás katasztrófák	8	9
egyéb	3	3

Általában egyetértenek a kutatók atéren, hogy mind az emelkedett vérnyomás, mind a szívrendellenességek erősen hozzájárulnak az agyi érkatasztrófák kialakulásához. A koszorúsér-betegségben szenvedők stroke rizikója ötször akkora, mint a normál populációé /Kannel és mtsai, 1978./

A gyanúsított rizikófaktorok: a glükóz-intolerancia /Flodin, 1986./, a vérlipid-összetétel megváltozása /Jürgens és mtsai, 1987., Sirtori és mtsai, 1979., Murai és mtsai, 1981., Airo és mtsai, 1985., Noma, 1979., Levy, 1984./, az emelkedett hematokrit és a dohányzás /McGee, 1973., Jajich és mtsai, 1984., Pollin és mtsai, 1984./. Az alkoholfogyasztás és a stroke fokozott rizikója között is összefüggést találtak. Az ateroembóliás agyi infarktus fő rizikótényezői a hipertenzió /Nguyen, 1985., Nag, 1984., Mero-de és mtsai, 1985., Schwartz és mtsai, 1984./, koszorúsér betegség /Altmann és mtsai 1987./, diabetes /Flodin, 1986./, bizonyos rendszerbetegségek, melyek az agyi keringést befolyásolják, a vér viszkozitása és koagulációja /Schneider és mtsai, 1987./, szív- és nagyereken végzett operációk komplikációi, valamint bizonyos gyógyszerek, mint pl. az orális fogamzásgátlók /Inman és mtsai, 1968., Kutas és mtsai, 1971./ szedése. Agyembólia lehet a következménye a billentyűk betegségének, a miokardiális infarktusnak, a szívritmus szabálytalanságainak /főleg pitvari fibrilláció/, ill. a szív-operációk komplikációinak. Az intrakraniális vérzés kongenitális anomáliák, mint pl. pitvar-kamrai rendellenességek, hipertenzió és véraladási zavarok következménye /Ross, 1983./ lehet. A stroke rizikójának csökkentése érdekében nagyon fontos a megelőzés, a rendszeres vérnyomás-ellenőrzés. Az USA felnőtt lakosságának 40 %-át kezelik enyhe hipertóniával, ahol a diasztolés nyomás 90 és 104 Hgmm közötti érték /Rabkin és mtsai, 1978./. Hazánkban az elmúlt 20 év során a szív- és érrendszeri halálozás abszolút értéke több, mint a felével nőtt. A 10.000 lakosra számított cerebrovaszkuláris eredetű halálozás az 1941-es 8,0 értékről 1981-ben 22,7-re emelkedett. Országos viszonylatban pl. évi 13-15.000 agyvérzésre kell számítani /Gyárfás és mtsai, 1983./.

A fent leírt agyi érbetegségek kórélettani aspektusait az alábbiakban szeretném ismertetni.

Ha a különféle okokból elszűkült, vagy elzáródott erek ellátási területei oxigén és tápanyagok nélkül maradnak, úgy rövid időn belül hipoxiás, illetve isémiás tünetek lépnek fel az érintett szövetrészben. Az idegsejtek táplálása főleg az oxigén és glükóz ellátástól, és így közvetetten a megfelelő agyi keringéstől függ, melyet az artériák, arteriolák és kapillárisok közvetítenek, illetve a venulák, vénák és durális szinuszok szállítanak el. Mivel a vér oxigéntartalma gyorsabban kimerül, mint annak glükóztartalma, így keringési rendellenességek esetén az idegsejtek nem kapnak megfelelő mennyiségű oxigént, ami hipoxiát eredményez, vagy extrém esetben anoxiát. Amikor a szív és/vagy érrendszer rendellenessége okoz keringésromlást, de az artériás vér oxigéntenziója és oxigéntartalma normális, azt pangásos hipoxiának nevezük. Amikor az elsődleges rendellenesség csökkenti az oxigéntenziót egyébként normál vérben, mint pl. fulladásban, akkor azt hipoxiás hipoxiának hívják. Beszélünk még anémiás hipoxiáról, ahol a hemoglobinnal mennyisége alacsony, vagy annak oxigénszállító képessége csökkent, mint pl. szénmonoxid-mérgezésben. Hipoglikémiában az agy képtelen hasznosítani az oxigént a glükóz-deficiencia miatt. A központi idegrendszer véráramlásának romlása lehet generalizált, mint pl. szisztémás hipotenzióban, vagy szív-megállásban, illetve helyi keringésromlásról beszélünk, amikor egy elzáródott artérián túli terület károsodik.

Szerencsére nem vagyunk teljesen védtelenek a hipoxiákkal szemben, ui. pl. a pangásos hipoxia káros hatásait bizonyos mértékben csillapítja az

agyi arteriolák autoregulációs kapacitása. Amint a szisztémás vérnyomás esik, az arteriolák kitágulnak, így az agyi vérátáramlás nem csökken. Ilyen esetekben hátráltatja még a hipoxiás károsodást, hogy a vérből nagyobb mennyiségű oxigén extrahálódik ki, növelve ezáltal az arterio-venózus oxigénkülönbséget. Amikor azonban az agyi vérátáramlás a normál érték kb. 25 %-ára csökken, kialakulnak a sejtmétabolizmus elégtelenségének jelei. A hipoxia következtében létrejött struktúrális változások részben a hipoxia mértékétől és időtartamától függnnek, és részben annak az időnek a hosszától, amíg a behatás elmúlik. Enyhe, rövid ideig tartó hipoxiás károsodás esetén előfordulhat, hogy csak átmeneti funkcionális romlás következik be, szerkezeti változások nélkül. Az anoxia irreverzibilis károsodásokat okozhat az idegsejtekben, és mivel az idegsejtek érzékenysége eltérő, előfordulhat, hogy csak bizonyos sejtcsoportokat ér károsodás. A különböző agyterületek érzékenységének sorrendje: agykéreg, bazális ganglion, agytörzs és gerincvelő. Az agykérgi rétegek közül a 3. 5. és a 6. a legérzékenyebbek. A központi idegrendszer sejtesei elemi különféleképpen reagálnak a hipoxiás körülményekre. Pl. egy órával a hipoxiás inzultus után a neuronok mitokondriumai megduzzadnak, krisztáik rendezetlenek lesznek. Az endoplazmás retikulum ciszternái és tubulusai ugyancsak megnagyobbodnak, és megindul a citoplazma mikrova-kuolizációja is /Brierley, 1976./. Feltehetően az ioncserélő pumpák elégtelen működésének köszönhetően sok K^+ -ion jut ki a perineurális extracelluláris folyadékba és ott a szomszédos asztrociták nyúlványainak ödémás duzzanatát okozza /Tower, 1979./. 2-12 órával a hipoxiás periódus után már az asztrocitámagok duzzadása következik be, amelyek a 4. 6. napon szaporodnak el maximálisan.



A hipoxiás károsodás tanulmányozására többféle kísérletes modell szolgál, amikor is az érelzáródást létrehozhatják lekötéssel, embolizációval /műanyag, acélgolyók, vasreszelék/, stb. Az elzáródott ér mérete befolyásolja a kifejlődő agyödéma típusát. Nagy agyi erek, mint pl. a középső agyi artéria (MCA) elzáródásával járó modellekben először citotoxikus ödéma jön létre /Hossmann és Schuier, 1979.a.b./, majd néhány óra múlva ezt követi a vazogén típusú ödéma /O'Brien és mtsai, 1974./. Ezzel szemben pl. több kis ér mikroembóliák miatti elzáródása elsődlegesen vazogén agyödémát okoz és ezután jön létre a citotoxikus ödéma /Vise és mtsai, 1977, Schuier és mtsai, 1978./.

Definíció szerint az agyödéma az agyszövet víztartalmának növekedése. A fent említett "MCA"-elzárás után már egy perccel létrejön egy korai agyduzzadás, amely érzékeny térfogatmérésekkel kimutatható, és amely a víz- és ionháztartás zavarával jár. A sejtek vízfelvétele szoros összefüggésben van az energiafüggő ioncserélő pumpák gátlódásával, mely gátlódás a membrán két oldalán levő ionkoncentrációk kiegyenlítését okozza, aminek eredményeként az agyszövet K^+ -tartalma csökken, Na^+ -tartalma pedig nő /Bremer és mtsai, 1978., Schuier és Hossmann, 1980./. A két kation inverz változásai miatt nagyon megemelkedik a Na^+/K^+ arány, amely érzékeny indikátora az isémiás sejtkárosodásnak, és amely szignifikánsan emelkedik már egy órával az "MCA"-elzárás után. A korai agyduzzadás, illetve víz-akkumuláció másik oka lehet a szöveti ozmolaritás emelkedése az isémiás területeken /ez feltehetően a tejsav-akkumulációjának következménye/. A citotoxikus ödéma létrejöttével kapcsolatos sejtduzzadás nagy jelentőségű az agyi infarktuszok kifejlődésében.

A duzzadás ui. túlnyomóan a perivaszkuláris asztroglia sejteket érinti és ezért a mikrocirkuláció kompresszióját okozhatja /Little és mtsai, 1976./. Ebből következik, hogy az ödéma súlyosbítja az elsődleges isémiás hatást, és végsőfokon a véráramlás teljes megszűnéséhez vezethet. Az "MCA"-elzáródás után 1-3 órával Flamm és mtsai /1978/ a cAMP mennyiség csökkenését mérték.

I.2.3. Ismereteink a vér-agy gátról

A "vér-agy gát" (VAG) fogalom alatt a vér és az agyszövet között fennálló gátrendszert értjük, mely bonyolult szabályozó mechanizmusok révén biztosítja az agy homeosztázisát. A barrier funkcióért elsősorban a kapilláris endotélium felelős, azonban annak tökéletes működéséhez hozzájárul a bazális membrán, valamint gliális, neuronális elemek is. A "vér-agy gát" koncepció megszületése óta eltelt 100 év alatt /Ehrlich, 1885./ nagyon sok új ismeretre tettünk szert, és ezek tükrében ma már az irodalom egy része "agy-gát rendszerről" beszél, jelezve, hogy az eredeti elképzelés a passzív gátról egyre inkább átalakul egy anatómiai, fizikokémiai és biokémiai mechanizmusokat egyesítő rendszerré /Lajtha, 1962./. A továbbiakban a széleskörűen elterjedt VAG fogalmat használom, amely azonban nem rendelkezik az eredeti passzív gát tulajdonságaival, hanem a mai értelemben vett aktív szabályozó felületek, mechanizmusok egész sorával, melyek az agyszövet mikrokörnyezetének összetételét irányítják. Visszatérve az eredeti koncepcióhoz: 1885-ben Ehrlich vette észre, hogy a szisztémásan beadott vitális, savas festékek, mint

a tripánkéék és Evans-kék minden szervet megfestettek, kivéve a központi idegrendszert. Ebből arra következtettek, hogy az agyszövetnek nincs affinitása a festékhez. Ezzel a felfogással Goldmann /1913/ nem értett egyet, ui. az általa közvetlenül a szubarachnoidális térbe juttatott tripánkéék diffúzan megfestette a központi idegrendszert.

Eredményei alapján arra az álláspontra helyezkedett, hogy az agyi erek impermeábilisak. Ez az elképzelés is sántított egy kicsit, hiszen az agynak hozzá kell jutnia valahogyan az esszenciális tápanyagokhoz. Mivel úgy tapasztalta, hogy a festék szisztémás adagolásakor a "choroid plexus"-ok tartalmaznak festékszemcséket, ezt az anatómiai struktúrát tartotta a kicserélődés helyének. Itt jutna tápanyagokhoz a cerebrospinalis folyadék (CSF) a vérből, majd az továbbitaná az agy felé. Ez az elmélet ilymódon egy passzív vér-CSF gát létét ismerte el, amelyben a kapillárisok nem kaptak szerepet. A harmincas évek elején Walter /1933/ és Spatz /1933/ felújították a hipotézist, miszerint az agykapillárisoknak alapvető szerepük van az agyszövet esszenciális anyagokkal való ellátásában és erre a CSF keringés nem volna képes megfelelő módon. Bázikus festékek szisztémás adagolásakor az agyszövet diffúzan festődött anélkül, hogy lényeges festődés lett volna a CSF-ben. Másrészt, a savas festékek nem jutottak be az agyba. Így nyilvánvaló volt, hogy az agyi erek résztvettek a központi idegrendszer permeabilitásának szabályozásában /Friedemann, 1942./. Ebben az időben már ismert volt az agyi kapillárisokat szorosan körülfogó gliatok létezése, amely megerősítette a VAG lehetőségét. Helyesen ismerték fel tehát egy vér-CSF és vér-agy közötti gát létezését, de helytelenül lokalizálták az előbbit a

choroid kapilláris, az utóbbit pedig a perivaszkuláris gliatok szintjére. Ma már tudjuk, hogy a choroid epitélium és az agyi kapillárisok endotéliuma játsza a vezető szerepet a gátfunkciók kialakításában.

Paradox módon, kb. 30 évvel ezelőtt, az elektronmikroszkópos vizsgálatok elterjedésekor, kétségbevonták egy szelektív érgát létezését, mivel a korai megfigyelések során nem találtak morfológiai különbségeket az agykapillárisok és a test más szöveteinek kapillárisai között.

Ez a nézet azonban nem sokáig tartotta magát, mert a jobb fixálási technikák bevezetésével hamarosan kiderült, hogy pl. jelentős extracelluláris tér van a központi idegrendszerben /Van Harreveld és mtsai, 1965./, amit addig nem tudtak érzékelni, valamint az elektrondenz jelzőanyagok megjelenésével lehetőség nyílt az endotélium átteresztőképességének vizsgálatára. A 40.000-es mólsúlyú tormaperoxidáz /Reese és mtsai, 1967., Brightman és mtsai, 1969./, a 17.000-es citokróm c /Milhorat és mtsai, 1973./, az 1.800-as mikroperoxidáz /Reese és mtsai, 1971./ éppúgy nem tudott keresztüljutni a kapilláris endotéliumon, mint a kolloidális lantán-hidroxid.

Amikor ezeket a jelzőanyagokat szisztémásan adták be, azok megrekedtek az endotélsejtek közötti hasadékokban a luminális oldalon, míg abban az esetben, ha intratékálisan juttatták be őket, szabadon áramlottak az agyszövetbe, ismét megrekedve azonban, de a kapilláris endotél abluminális oldalán, az interendoteliális hasadékokban. A szomszédos endotélsejt membránokat összekapcsoló különleges struktúrákat "tight junction"-oknak nevezték el /Brightman és mtsai, 1969./.

Ezek a speciális szerkezetek olyan szorosan kapcsolják egymáshoz az endotélsejteket, hogy azok úgy viselkednek, mint egy folyamatos sejtréteg, ezért az átjutni kívánó anyagoknak keresztül kell menniük a sejten. Az interendoteliális tér mindössze 12 Å széles. Az agykapillárisok képezik a VAG legfontosabb részét; 1 g agyszövet endotélfelületét kb. 240 cm²-re becsülik /Crone, 1963./. Ugyancsak Crone /1971/ hangsúlyozta, hogy a teljes VAG felület, tehát az agykapillárisok endotélfelületének 5000-szer nagyobb a choroid kapillárisok endotélfelületénél. Különös tulajdonsága az agykapillárisoknak, hogy külső felületüknek kb. 80 %-át gliasejt nyúlványok veszik körül. Az endotélsejtek és a gliatok között vékony, megszakíthatatlan bazális membrán fut. Jellemző morfológiai tulajdonságuk az agykapillárisoknak a mitokondriumok bősége. A citoplazma 8-11 %-a mitokondrium, míg más szervek kapillárisaiban ez az érték csupán 2-5 %. Ezt a tényt az agyi endotélium biológiai specializációjának tekintették, amely ily módon képes működtetni a nagy energiaigényű transzportrendszereket, jelentősen hozzájárulva az agy homeosztázisának fenntartásához /Oldendorf és mtsai, 1975./. A kapilláris endotéliumban nagyon gyér, vagy hiányzik a vezikuláris transzport /Reese és mtsai, 1967., Clawson és mtsai, 1966./, így a pinocitózis kis szerepet játszik az ép VAG-on keresztüli transzportban. A VAG fizikokémiai és biokémiai tulajdonságai a fent leírt anatómiai sajátosságokból adódnak, és amelynek működése hasonlít a sejtmembránhoz, közvetíti az anyagok be- és kilépését a központi idegrendszer(be)ből. Fizikokémiai tulajdonságait tekintve úgy viselkedik, mint egy folyamatos lipid kettős-réteg, különféleképpen gátolva az anyagok átjutását a transzcelluláris

koncentráció grádienstől, molekulamérettől és lipidoldékonyságtól függően, engedelmeskedve a passzív diffúziós szabályoknak. Ami a biokémiai tulajdonságokat illeti: vannak olyan jelentős metabolitok, mint az aminosavak, némely szerves savak és az agysejtek fő üzemanyaga a glükóz, amelyekre az agy permeabilitása jóval meghaladja ezen anyagok gyenge lipidoldékonyságát. Ezeknek az anyagoknak mindkét irányban történő mozgását speciális proteinek teszik lehetővé, melyek a sejtmembránban helyezkednek el, és képesek ezeket az anyagokat felismerni, megkötni és átjuttatni a membrán túloldalára. Ezt a "carrier médiálta" transzportot hívjuk "facilitált diffúzióknak", ha az egyenlő koncentrációkat teremt mindkét oldalon és ezért nem használ energiát. "Aktív transzportnak" hívjuk a folyamatot, amennyiben az anyagtranszport koncentráció gradiens ellenében történik, és energiát igényel. Sok aminosav transzportja Na-függő és ouabainnal gátolható, melyekről feltehető, hogy ATP-ázzal működő Na-gradiensek tartják fenn őket. A Na^+ , K^+ -ATPáz az agyszövet sejtjeinek legjelentősebb energiafogyasztója. Az oxigénfogyasztás intenzitása 70 %-kal csökken, ha ouabainnal kezeljük a szövetet, amely kizárólag a Na^+ , K^+ -ATPáz gátolja. A glükóz és az aminosavak aktív transzportját a következő szellemes transzport modell írja le /Bíró, 1977./: a glükózt a sejtbe egy specifikus carrier rendszer viszi be, melynek a glükózkötő helyén kívül még egy Na-kötő helye is van. Mivel a Na^+ , K^+ -ATPáz működése következtében a külső Na^+ -koncentráció mindig sokkal nagyobb, mint a belső, a carrierhez kötött Na^+ passzív transzporttal bejut a sejtbe, de közben viszi magával a szintén a carrierhez kötött glükózt. Ily módon a glükóz koncentráció-gradiens ellenében is bejuthat a sejtbe.

Az agy számára különösen fontos a rendszeres glükóz ellátás, mivel nincsenek energiatartalékai, igényei viszont óriásiak. Ha az artériás glükózsint az 5-7 mM-os normál értékről kb. 1 mM-ra leesik, hipoglikémiás szimptómák jelentkeznek, ami az agyfunkciók megváltozásához vezet. Kb. 0,5 mM-os plazmaszinten coma áll be /Rapoport, 1976./. Szerkezetükben hasonló cukrok, mint pl. a galaktóz, képesek a glükóz transzportot befolyásolni. Galaktozémiában /Kalckar és mtsai, 1973./ a galaktóz plazmaszintjének kóros emelkedése eredményeként versengés alakul ki a VAG transzport helyein a glükózzal. Ennek következtében az agysejtek nem jutnak elegendő glükózhoz, az agy károsodik. A VAG szelektív permeabilitását szabályozó rendszereken kívül kísérleti bizonyíték van olyan enzimikus csapda mechanizmus létezésére, amely meggátolja a biológiailag aktív anyagok bejutását az agyba.

Hisztokémiailag számos enzimet mutattak ki az agyi kapillárisokban, mint a GABA-transzamináz, szukcinil-szemialdehid-dehidrogenáz, pszeudokolinészteráz, MAO, DOPA-dekarboxiláz, amelyek lebontják saját szubsztrátjukat, amint az keresztülhalad az endotélsejten /Bertler és mtsai, 1966., Hardebo és mtsai, 1980., Kalaria és mtsai, 1987./.

Vannak a központi idegrendszernek olyan területei, ahol nem alakult ki a VAG, az itteni kapillárisok nem rendelkeznek "tight junction"-nal, az endotélsejtek fenestráltak és sok pinocitotikus vezikulát tartalmaznak. Ilyen területek a neurohipofízis, tobozmirigy, "median eminence", "area postrema", "subfornical organ" és a "supraoptic crest" /Lee és mtsai 1982./. Ezeken a területeken a sejteknek többnyire hormonszekréciós, vagy kemoreceptor funkciójuk van, ezért direkt kapcsolat szükséges a vérrel.

I.2.4. A nyúl, mint az ateroszklerózis kutatás modellje

A nyúl az aterogenezis kutatásában széleskörűen alkalmazott kísérleti állat /Rosenblum és mtsai, 1975., Bordia és mtsai, 1975., McCully és mtsai, 1975./ .A különféle beltenyésztett törzsek között, sőt a nemek között is jelentős különbségek vannak az aterogén diétákkal szembeni érzékenységben, a plazma lipoproteinek összetételében és a diéták hatására bekövetkező megváltozásukban is /Mills és mtsai, 1971., Alexander és mtsai, 1973., Clarkson és mtsai, 1976., Johansson és mtsai, 1976., Pescador, 1978./ . A betegséget létrehozó modellek általában a következőképpen csoportosíthatók: táplálkozási, fizikai, kémiai, immunológiai /Vesselinovitch és Fischer-Dzoga, 1981./ és genetikai modellek. Esetünkben a táplálkozási modellt alkalmaztuk a betegség indukálására. Leggyakrabban használatos az Új-Zélandi törzs. A szérum lipoproteinek összetételét sokféleképpen megváltoztathatjuk. A tápba kevert koleszterin hatására jelentősen megemelkedik a szérum koleszterinszintje, az emelkedett VLDL-nek és IDLnek köszönhetően /Schumaker, 1956., Camejo, 1973./ . Ha az állatot koleszterin-mentes félszintetikus diétán tartjuk, amely kazeint vagy más proteineket tartalmaz, a hiperkoleszterinémiának olyan formája alakul ki, amikor főleg az LDL mennyisége növekszik meg a szérumban /Hamilton és mtsai, 1976., Huff és mtsai, 1977./ . Az eltérő lipoprotein összetétel ellenére azonban az állatokban hasonló elváltozások alakulnak ki /Ross, A.C. és mtsai, 1978./, jelezve, hogy a plakkok tulajdonságai az érfali jellemzőktől függenek, nem pedig az etiológiai ágensektől /Bjorkerud, 1974., Vesselinovitch és Fischer-Dzoga, 1981./ .

A nyúl, mint az érelmeszesedés kutatók háziállata, azért tett szert nagy népszerűsége, mert érzékenysége miatt könnyen kialakul benne a betegség, viszonylag olcsó, és a legdöntőbb, hogy az erekben létrejött morfológiai elváltozások hasonlítanak a humán elváltozások egy részéhez. Természetesen az állatmodellen kapott eredményeket nem vonatkoztathatjuk egy az egyben az emberre.

II. Vizsgálati anyagok és módszerek

II. 1. Koleszterin-szkerózis

A kísérletekhez 2,5 - 3,0 kg-os hím, Új-Zélandi beltenyésztett nyulakat használtunk. A munka megkezdése előtt a környezethez való alkalmazkodás céljából kb. 7 napig normál tápon tartottuk az állatokat. A kísérlet során minden állatot külön ketrecbe helyeztünk.

Az állatok etetése a kísérlet alatt:

A kontroll állatok naponta kb. 20 dkg normál nyúltápot kaptak. Az érelmeszesedést 2 % koleszterinnel kiegészített nyúltáp etetésével hoztuk létre, 8 héten keresztül. A diéta kezdetén és végén meghatároztuk a szérum összkoleszterin tartalmát Rappaport és Eichorn módszerével.

II. 2. Szérum összkoleszterin meghatározása

/Rappaport és mtsai, 1960./

Az állatok fülvénejából 24 óra éhezés után vért vettünk száraz tüvel /3-4 ml/, amelyet fél óráig szobahőn tartottunk, majd lecentrifugáltuk /3000 rpm, 10 perc, Janetzky K 26/. A szérumokhoz tartósítást végett minimális Na-azidot adtunk, majd mélyhűtőben tároltuk a meghatározásig. A meghatározás lényege, hogy a koleszterinből és észtereiből ecetsavanhibriddel hígított kénsav hatására vízmentes közegben intenzív kékeszöld polimer, telítetlen szénhidrogének keletkeznek. A színintenzitás kolorimetrálható. A fehérjék oldódását az erős anionként szereplő szulfoszalicilsav biztosítja.

Reagensek:

1. 50 g szulfoszalicilsav 500 ml jégcetben oldva, majd kiegészítve jégcettel 1000 ml-re
2. ecetsavanhidrid
3. kénsav cc.
4. 5,17 mM koleszterin-standard /absz. alkoholban/

Reakcióelegy: 350 ml 1. + 650 ml 2. + 100 ml 3. oldat
100 μ l mintát + 5 ml reakcióelegyet jól elkevertünk, 30 percig állni hagytuk, majd 620 nm-en fotometráltuk.

A kalibrációs egyenest a koleszterin-standard hígításaiból készítettük /1,0 - 6,0 mM/.

II.3. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A vizsgálati mintákat Karnovsky rögzítőben /pH 7,4/ előfixáltuk /anyagtól függően 1-24 óra; 4°C/, Millonig pufferrel /pH 7,4/ kimostuk és ozmium-tetroxidban /1%/ utófixáltuk /1 óra/. Millonig pufferes mosás után felszálló alkoholsorban víztelenítettük, blokkban kontrasztoltuk 20 percig (uranil-acetát/70 % alkohol), majd Durcupan ACM, vagy Spurr műgyantákba ágyasztuk. A fél- és ultravékony metszeteket üveggéssel készítettük Porter Blum és Tesla ultramikrotómokkal. A félvékony metszeten toluidinkék festést alkalmaztunk, az ultravékony metszeteket pedig uranil-acetáttal, majd ólomcitráttal kontrasztoltuk. A metszeteket Tesla BS 540, illetve JEM 100 B elektronmikroszkópokban vizsgáltuk 80, illetve 60 kV gyorsító feszültséggel.

II.4. Kis sűrűségű lipoprotein (LDL) izolálása nyúlszérumból /Terpstra és mtsai, 1981. módosított módszere/

Altatott állat hasi aortájából kb. 80 ml vért gyűjtöttünk, amelyből centrifugálás után (3000 rpm, 10°C, 30 perc, Janetzky K26) kb. 30-40 ml szérumot nyertünk /1. ábra/. Terpstra módszerét annyiban módosítottuk, hogy első lépésként egy lipoprotein /LP/-dús frakciót állítottunk elő ultracentrifugálással, majd ezt a vegyes LP frakciót választottuk szét Terpstra szerint különböző sűrűségű LP-kre.

A LP-dús frakciót a következőképpen nyertük:

Cellulóz-nitrát centrifugacsövekbe 0,77 g KBr-t és 0,05 g szacharózt mértünk, amelyre 2 ml szérumot pipettáztunk. E fölé 10 ml 20°C = 1,25 g/ml-es oldat (3,85 g KBr + 0,25 g szacharóz/deszt.víz) került. Egyik centrifugacsőben megfestettük a szérumot 0,2 ml Sudan black B festékkoldat hozzáadásával. A szérumokat SW 41 rotorban 40.000 percenkénti fordulatszámmal (272.000 g), 20°C-on 22 órán keresztül centrifugáltuk Beckman L5-50, illetve Beckman L2-65 ultracentrifugákban. A LP-dús frakciót perisztaltikus pumpával szívtuk le a centrifugacsövek tetejéről. A frakció dializálása után /DPBS + 0.01 % EDTA/ a különböző sűrűségű lipoproteinek szétválasztására a következő összetételű grádi-entst készítettük el: cellulóz-nitrát cső aljára bemértünk 0,77 g KBr-t és 0,05 g szacharózt, amelyre 2 ml LPdús frakciót pipettáztunk; egyik cső esetében 0,2 ml Sudan black B festékkoldattal kevertük össze a szérumot. Ezután két sórétég és egy deszt.vizes réteg következett.

- I. sórétég: ρ 20°C = 1,225 g/ml
NaCl $11,42 \times 10^{-3}$ g/ml
KBr $315,54 \times 10^{-3}$ g/ml
EDTA 10^{-4} g/ml
- II. sórétég: ρ 20°C = 1,1 g/ml₃
NaCl $11,42 \times 10^{-3}$ g/ml
KBr $133,48 \times 10^{-3}$ g/ml
EDTA 10^{-4} g/ml
- III. deszt.víz réteg
EDTA 10^{-4} g/ml

A rétegeket kapilláris-vékonyságúra kihúzott Pasteur pipettával töltöttük egymásra. SW 41 rotorban 20°C-on 40.000-es percenkénti fordulatszámmal (272.000 g) 22 órán keresztül centrifugáltuk az említett ultracentrifugák valamelyikében. A centrifugálás eredményeképpen a lipoproteinek szépen elkülönültek, a rétegeket perisztaltikus pumpa és frakciószedő készülék segítségével gyűjtöttük össze. A LP-frakciók minőségét dializálás után /DPBS+0,01% EDTA/ agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Sudan black B festékkoldat:

0,1 g Sudan Black B-t feloldottunk 100 ml etilén-glikolban 65°C-on (2 perc erőteljes kevergetés), majd szűrőpapíron átszűrtük.

II.5. Agaróz gélelektroforézis

Az eljárás lényege, hogy a lipoproteinek lúgos közegben negatív töltéssel rendelkeznek és a pozitív pólus felé vándorolnak. A vándorlási, sebességet a molekula nagysága és a felületi töltések mennyisége szabja meg. A frakciók elválasztását 0,7 %-os agaróz gélen végeztük 2 óra hosszáig, 20-40 mA áramerősség mellett.

A lipoprotein frakciókat 0,2 %-os géllal hígítottuk 1 : 1 arányban. Festésük Sudan black B-vel történt.

II.6. Fehérje tartalom meghatározása Lowry (1951) szerint

A oldat: 2% Na_2CO_3 0,1 n NaOH-ban

B₁ oldat: 0,5 % CuSO_4

B₂ oldat: 1% K,Na-tartarát

C reakcióelegy: 50 ml A + 1 ml B₁ + 1 ml B₂ oldat (használat előtt)

500 μl mintát + 3 ml reakcióelegyet 10 percre állni hagyunk, majd

300 μl Folin reagenst adtunk hozzá.

Fél óra múlva 750 nm-en mértük az extinkciót. A kalibrációs egyenes 10-400 μg marha szérum albumint tartalmazó fehérjemintákkal készült.

II.7. Kolloidális aranyoldat készítése /Frens, 1973./

50 ml 0,01 %-os $\text{H/AuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ -ot felforraltunk egy 500 ml-es Erlenmeyer lombikban, majd hozzáadtunk 1,6 ml 1 %-os trinátrium-citrátot. 5 perc forralás után vízszintes, piros oldat keletkezett, pH-ja 5,5 volt. Megközelítőleg 1×10^{12} kolloidális arany részecskét tartalmazott ml-enként, melyek átmérője kb. 19 nm volt.

A preparátum minőségét Tesla BS 540 elektronmikroszkóppal ellenőriztük.

II.8. Kis sűrűségű lipoprotein /LDL/ jelölése kolloidálás arannyal /Handley és mtsai, 1981./

10 ml-es centrifugacsőbe pipettáztuk az LDL-t (100 μg LDL/500 μl deszt.víz), majd 5 ml kolloidális aranyat adtunk hozzá gyors sugárban, keverés nélkül /2. ábra/. Ezután 35 %-os, majd 50 %-os szacharóz oldatokat rétegeztünk alá kapilláris végű Pasteur pipettával. 5000-es percenkénti fordulattal 60 percig centrifugáltuk őket Janetzky K26 centrifugában. Centrifugálás után a két szacharóz réteg határán gyűlt össze az arany jelzett lipoprotein frakció. Ezt a réteget leszívtuk, 1 éjszaka át dializáltuk /DPBS + 0,01% Na-EDTA/, majd ellenőriztük a konjugátum stabilitását 0,5 M NaCl segítségével (az oldat piros színe szürkévé változik NaCl hatására, ha nem kötődik fehérje az arany szemcsékhez). Szenezett hártás grídre vittük az Au-LDL komplexet, majd UA 5 %-os, vagy PTA 1 %-os oldatával többször festettük. Ezután deszt.vizes öblítés és szárítás következett.

A konjugátum minőségét negatív festés után Tesla BS 540 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk /23. kép/.

II.9. Marha szérumbalbumin (BSA) jelölése kolloidális arannyal /Handley és mtsai, 1981., módosított módszer/

100 µg marha szérumbalbumint felhígítottunk 400 µl deszt.vízzel, majd gyors sugárban hozzáadtunk 5 ml kolloidális aranyoldatot. Ezt a fehérjemennyiséget 0,5 M-os NaCl oldat segítségével állítottuk be. Ez az a minimális fehérjemennyiség, amely stabilizálja az aranykolloidot, így a NaCl nem tudja azt redukálni. A konjugátum minőségét Tesla BS 540 elektronmikroszkóppal ellenőriztük, negatív festés után. A negatív festés 5 %-os vizes uranyl-acetáttal, vagy 1 %-os foszfor-wolframsavval történt, formvar hártvás, szenezett gríden.

II.10. Permeabilitás vizsgálat Evans késsel /Nitsch és mtsai, 1984./

A módszer azon alapszik, hogy az Evans kék azofesték a vérplazmában a plazmafehérjékhez adszorbeálódik, elsősorban az albuminhoz. A festék UV-fényben pirosan fluoreszkál, ily módon nyomkövethető a szérumbalbumin extravaszkuláris útja.

Az állatok 0,5 ml Evans kék oldatot kaptak 100 g testsúlyra intravénásan, a következő összetételű festékoldatból:

- 2 % Evans kék
- 0,9 % NaCl
- 2 mM EGTA

A festék beadása után 24 órával öltük le az állatokat, Krebs-Ringer oldattal perfundáltuk az agyukat.

Az agykéreg parietális lebenyéből metszettünk ki szövetmintákat, amelyeket Karnovsky fixálóban tartottunk feldolgozásig.

A fixálót többszöri mosással foszfát pufferre cseréltük, amely 20 % szacharózzal volt kiegészítve /a fagyasztással járó szövetkárosodások kivédésére/. Az így előkészített agykéreg darabból fagyasztott metszeteket készítettünk /Jung fagyasztó mikrotóm/, foszfát pufferrel fedtük és Zeiss NU 2 kutatómikroszkóppal vizsgáltuk. Az UV fényt HBO 200-as lámpával gerjesztettük, BG 3-as hőszűrőt, BG 12-es gerjesztő szűrőt, valamint OG 1-es zárószűrőt alkalmaztunk.

Sötétlátóterű kondenzort használtunk, melynek frontlencséje és a tárgy-lemez közé fluoreszcencia-mentes immerziós olajat cseppentettünk.

II.11. Nyúl szérumbalbumin immunhisztokémiai kimutatása

Az elaltatott és 30 percig Somogyi-Takagi fixálóval perfundált állat agyát 70 %-os alkoholban 1 napig mostuk.

Az agyszövetet víztelenítettük, paraffinba ágyasztuk, majd metszeteket készítettünk belőle. A metszeteket deparaffináltuk és a következő inkubációs elegyekbe helyeztük:

1. preinkubálás normál szérumbalbuminnal 30 perc
2. inkubálás antiszérumbalbuminnal 30 perc
3. kezelés ARGG-vel /anti-nyúl-IgG juh szérumbalbumin/ 30 perc
4. PAP-komplex /peroxidáz-antiperoxidáz/ 30 perc
5. előhívás DAB-al 10 perc
6. víztelenítés, lefedés Entellánnal

II.12. Túlélő agykapilláris preparátum készítése in vitro kísérletekhez /Hwang és mtsai, 1980., módosított módszer/

A kísérletekhez Új-Zélandi hím nyulakat (2,5 - 3,0 kg) használtunk, az altatás Pentobarbital-Na-sóval /iv. 12,5 mg/ml/ történt /3. ábra/. A Krebs-Ringer oldattal perfundált állatok agyát eltávolítottuk, majd oxigenált RPMI 1640 tápoldatba helyeztük. A további lépéseket 4°C-on végeztük. Az agykérget megtisztítottuk a fehérállománytól, eltávolítottuk a lágy agyhártyát, majd apróra daraboltuk és felfuszpendáltuk 5 mM Na-EDTA-t és 50 mM Tris-t tartalmazó 0,25 M-os szacharózban. Üvegteflon potter segítségével kézzel homogenizáltuk a szürke állományt, majd Cornwall fecskendő segítségével nylon szűrőkön nyomtuk át. A szűrés 3 fokozatban történt, először egy nagyobb 330 µm-s, majd 125 µm-s, végül 50 µm pórusméretű nyilonszűrőn. Ily módon 3-3 alkalommal szűrtük a szövetet, végül az összegyűjtött kapillárisban dús frakciót 10 %-osra hígítottuk 0,25 M-os szacharózzal. A homogenizátumot alacsony fordulatszámmal lecentrifugáltuk /1500 g, 10 perc, Janetzky K26/. A felülúszót leöntöttük, és az üledéket, amely a kapillárisokat tartalmazta RPMI 1640 tápoldatban felfuszpendáltuk 10 %-osra.

II.13. Agykapilláris preparátum vitalitásának vizsgálata

Kétféle vitalitás-tesztet, illetve festési metodikát alkalmaztunk:

1. Tripánkék festés

a oldat: 0,2% tripánkék deszt.vízben

b oldat: 4,25% NaCl

Használat előtt a + b = 4 : 1

9 egység festékeverékhez 1 egység sejtszuspenziót cseppentettünk és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk kb. 1 perv múlva. A pusztult sejtek kékre színeződtek, míg az élők nem vették fel a festéket.

2. Festés fluorescein diacetáttal

/Lionetti és mtsai, 1977./

a törzsoldat: etídium bromid 200 µg/ml HBSS
(Hanks Balanced Salt Solution, Ca²⁺ - mentes)
tárolás: fagyasztva

b törzsoldat: fluorescein diacetát 5 mg/ml aceton (-20°C)

Festőoldat: 24,5 ml HBSS (Ca²⁺-mentes)

50 µl etídium bromid

100 µl fluorescein diacetát

A festőoldat 0,5 ml-ét összekevertük 2 csepp sejtszuspenzióval, ebből tárgylemezre cseppentettünk és lefedve vizsgáltuk azt fluoreszcens mikroszkópban, sötétlátóterű kondenzorral.

A pusztult sejtek pirosan, az élők zölden fluoreszkáltak.

II.14. Agykapilláris preparátum készítése biokémiai vizsgálatokhoz /Joó és Karnushina, 1973./

A Krebs-Ringer oldattal perfundált agyakat 4°C-os 0,25 M-os szacharóztápoldatba helyeztük, majd az agykérget 4°C-on tisztítottuk. A zselat-felaprított szürkeállományt 330 µm pórusméretű nyilonszűrőn 3x préseltük át Cornwall fecskendő segítségével, majd ugyancsak 3x szűrtük 125 µm pórusméretű szűrőn.

50 mM Tris-t (pH 7,2), 5 mM Na-EDTA-t tartalmazó 0,25 M-os szacharóz oldatban szuszpendáltuk fel a homogenizátumot 10 %-osra. Az agykéreg-szuszpenziót 10 ml-es üvegpipettába való többszöri felszívással-kifúvással tovább homogenizáltuk. Ezután mintát vettünk, toluidinkékkel megfestettük, és fénymikroszkóppal ellenőriztük a preparátum minőségét. Janetzky K26 centrifugában 5000 g-n /3500 rpm/ 10 percig centrifugáltuk, majd az üledéket 0,25 M-os szacharózban szuszpendáltuk fel 1 g/10 ml-re. Ismét lecentrifugáltuk /3500 rpm, 10 perc/, az üledéket pedig 0,25 M szacharózban 1 g/2 ml-re szuszpendáltuk, és háromlépcsős szacharóz grádiensre rétegeztük. A grádiens 1,5 M, 1,3 M és 1,0 M koncentrációjú szacharóz rétegekből állt. A centrifugálást Beckman L2-65 típusú ultracentrifugában végeztük 20.000-es percenkénti fordulatszámmal (30 perc, Spinco SW 25,1 vagy SW 27 rotor/. A kapillárisok a centrifugacső aljában ülepedtek ki, ezeket a felülúszó eltávolítása után 2 ml 0,25 M-os szacharóz oldatban szuszpendáltuk. Egyszeri preparáláshoz általában 4 nyúlágyat használtunk fel.

II.15. Adenilcikláz enzimaktivitás mérése agykapilláris preparátumban

Az adenilcikláz aktivitást Hegstrand és mtsai /1976/ módszerével mértük. Az inkubációs elegyek általában 30-50 μ g fehérjét tartalmaztak. A mintákban az inkubáció során képződött cAMP mennyiségét /Brown és mtsai, 1971./ ún. protein-kináz kötési módszerével határoztuk meg

II.16. Na^+ , K^+ -ATP-áz enzim aktivitás mérése agykapilláris preparátumban /Sun és mtsai, 1970./

Az enzimaktivitást szervesen foszfát felszabadító képessége alapján mértük 1 mM ouabain jelenlétében, illetve hiányában. A ouabain a Na^+ , K^+ -ATPáz specifikus gátlója. A Ca^{2+} megkötésére EGTA volt jelen a mintákban. Az inkubációs elegy végkoncentrációja a következő volt:

2 mM ATP, 0,1 M Tris-HCl /pH 7,5/, 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 20 mM KCl

A elegy: + 1 mM EGTA

B elegy: + 1 mM EGTA + 10^{-4} M ouabain

Az inkubációs elegyek általában 50-200 μ g fehérjét tartalmaztak 500 μ l-ben. Az inkubáció az enzimeforrás hozzáadása után az ATP bemérésével indult, 37°C-on és 30 percig tartott. A reakciót ötödrésznyi jég hideg 30 %-os TCA-val állítottuk le /5 % végkoncentráció/, és jégre tettük a mintákat. Majd 12.000 g-n 2 percig centrifugáltuk. A felülúszóból foszfátot határoztunk meg.

Az anorganikus foszfát meghatározása /Rathbum és mtsai, 1968./

A felülúszóból vett 0,1 ml-es mintában határoztuk meg a foszfát tartalmát. 1,5 ml deszt.vizet + 1 ml 3 M-os acetát-puffert /pH 4,2/ és 0,2 ml 1 %-os ammónium-molibdenátot adtunk hozzá, 15 mp múlva 0,2 ml 6,75 mM SnCl_2 -t. Kb. 15 perc múlva 735 nm-en mértük az oldatok extinkcióját. Kalibrációs egyenest NaH_2PO_4 oldat 10-100 nmol foszfátot tartalmazó mintáiból készítettünk.

II.17. Agykéreg K^+ és Na^+ tartalmának meghatározása atomabszorpciós módszerrel

A vizsgálat céljára 5 különböző agyi területről vettünk kb. 1 g-os mintákat: agykéreg, hipotalamusz, talamusz, hippocampus és kisagykéreg. Kiszáritás után kémcsőbe helyeztük a szövetdarabokat és a következő elegyben roncsoltuk min. 180 percig: 96 % H_2SO_4 , 1 ml + 30 % H_2O_2 , 2 ml /elszívó fülke alatt, roncsoló készülékben, $280^\circ C$ -on/. A H_2O_2 elpárolgása után az oldatot lehűtöttük, feltöltöttük deszt. vízzel 10 ml-re és elvégeztük az atomszorpciós méréseket.

II.18. Fibroblaszt sejtek izolálása nyúlfülből

A fibroblaszt sejteket nyúlfül bőréből vett biopsziával nyertük. A sejteket BOB Minimal Essential Mediumban /BOB MEM/ tartottuk fenn, amely ki volt egészítve 10 % borjúsavóval /FCS/. A tenyésztő edényeket 5 % CO_2 és 95 % levegő tartalmú párás légtérben, $37^\circ C$ -on tartottuk. A kísérletekhez a 2. passzálás után használtuk a sejteket.

II.19. In vitro kísérletek fibroblaszt sejttenyészetén

A kísérlet előtt kb. 4 órával a sejteket kiéheztettük LDL-re oly módon, hogy a tápoldatot átcseréltük friss BOB MEM-re, amely lipoproteinmentes nyúlszérummal volt kiegészítve. Ezután lecseréltük a sejtekről a tápoldatot a kolloidális arannyal jelzett LDL-t tartalmazó BOB MEM tápoldatra, és $37^\circ C$ -on 3-4 órán keresztül inkubáltuk őket. Az inkubálás után erőteljes mosás következett 0,2 % BSA-val kiegészített foszfát-pufferolt sóoldattal /DPBS/, majd DPBS-sel $4^\circ C$ -on. Karnovsky fixálóban rögzítettük a sejteket /1-2 óra, $4^\circ C$ /, OsO_4 -ban /1%/ utófixáltuk /1 óra/, majd műgyantába ágyasztuk őket /Durcupan ACM/. Az ultravékony metszeteket uranyl-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk, és Tesla BS 540 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

II.20. Vérnyomásmérés véres úton

Az elaltatott állat feltárt és megnyitott arteria carotis communisába manométerrendszert csatlakoztattunk, amelyen közvetlenül leolvashattuk a vérnyomást. A tracheába kanült kötöttünk be. A mérést Transducer készülékkel végeztük.

II.21. Arteria carotis communis és vena jugularis kipreparálása /Kovách, 1954./

Az altatott állat nyakán 3-5 cm-es metszést végeztünk középen, majd a musculus sternocephalicus belső szélén addig preparáltunk, amíg ujjal el nem értük a pulzáló carotist. Az érhüvelyt a benne futó vagussal együtt fogászati csipesszel kiemeltük és a carotist különválasztottuk. Kissé oldalt, közvetlenül a bőr alatti kötőszövetben található a jugularis externa.

II.22. LDL-perfúzió

Az állatokat Nembutallal altattuk /12.5 mg/ml/, majd üvegkanült helyeztünk a tracheába. A jobb oldali a. carotist és a bal oldali vena jugularist preparáltuk ki. A szív bal kamráján keresztül DPBS-t /150-200 ml, 37°C/ perfundáltunk keresztül, miközben a vena jugularison hasonló mennyiségű vért engedtünk le, majd elzártuk azt. Ezután szárnyas kanült vezetünk az a. carotisba, és ezen keresztül juttattuk az agyba az arany jelzett LDL-t (LDL-arany/RPMI 1640, 37°C). Kb. 10 perc várakozás után DPBS-t perfundáltunk a szíven keresztül /150-200 ml, 4°C/, majd Karnovsky fixálót /4°C/.

II.23. Agy sűrűségének meghatározása Percoll grádiensen

/Tengvar és mtsai, 1982., 1983., Nitsch és mtsai, 1984./

Az agy sűrűségének mikrogravimetriás módszerrel történő meghatározása kvantitatív módszer az agyödéma tanulmányozására. A meghatározás céljára lineáris sűrűség-grádienszt készítettünk Percoll, szacharóz és NaCl oldatokból. A grádienszt perisztaltikus pumpa (5 ml/ perc kapacitás) segítségével egy sűrű és egy híg oldat egyenletes keverésével (dupla kamrás grádiens keverő) kalibrált üveghengerekben készítettük. A Percoll kolloidális szilíciumdioxid részecskékből áll, melyek polyvinyl pyrrolidone-nal vannak fedve, átmérőjük 14-30 nm. A kísérletekhez 300 vagy 500 mOsm/l ozmolaritású Percoll sűrűség-grádienszt használtunk.

Percoll törzsoldatok készítése:

300 mOsm/l	1 rész	1,5 M NaCl
	9 rész	Percoll
500 mOsm/l	1 rész	2,7 M NaCl
	9 rész	Percoll

Az ozmotikus nyomás ellenőrzésére a grádiens 5 különböző szintjéről duplán vettünk mintát, melyeknek meghatároztuk az ozmolaritását /Knauer féle Halbmikro-Osmometer/. A kísérletekhez a perfundált agy öt különböző területéről, de minden állat esetében azonos területről vettünk mintát kb. 2-3 perc alatt, nedves kamrában. A kb. 30 mg súlyú mintákat egy erre a célra kialakított speciális eszközzel nyertük. A grádiens tetejére helyeztük őket, melyek a sűrűségüknek megfelelő mélységbe süllyedtek. Ezt az értéket 5 perc elteltével olvastuk le.

II.24. Agy víztartalmának meghatározása a klasszikus nedves/száraz módszerrel

A Krebs-Ringer oldattal perfundált állat agyát nagyon gyorsan eltávolítottuk /kb. 2 perc/, majd nedves kamrában vágtuk ki a vizsgálandó agyterületek 1 g-os darabjait mindkét agyféltekéről. Ezek a következő területek voltak : nagyagykéreg, kisagykéreg, hippocampus, hipotalamusz, talamusz. Előre lemért alufólián megmértük az agydarabok nedves súlyát, majd 100 °C-on súlyállandóságig szárítottuk őket /több nap/. Ezután lemértük a száraz súlyokat és a következő képlet alapján kiszámítottuk a víztartalmat:

%/víztartalom/= $\frac{\text{nedves súly} - \text{száraz súly}}{\text{nedves súly}} \times 100$

A méréseket olyan állatok agyán is elvégeztük, melyeket előzőleg nem perfundáltunk.

II.25. Szérum ozmolaritás mérése

A szérummintákat lecentrifugáltuk /3000 rpm, Janetzky asztali centrifuga, 10 perc/, majd a felülúszó 150 μ l-ét használtuk fel a méréshez. A méréseket Automata Osmometer /Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged/ segítségével végeztük. Standard oldatként 400 mOsm/l-s NaCl-ot használtunk.

II.26. Agypapilláris - plazmamembrán zsírtartalmának és zsírsav összetételének mérése

A kapillárisfrakció koleszterin és foszfolipid tartalmát lángionizációs vékonyréteg technikával mértük, egy Iatroscan TH-10 típusú készülékben. A membrán zsírsav összetételének meghatározása gázkromatográf segítségével történt, egy Jeol 20 K típusú készülékben, amelyhez egy Packard 604 típusú integrátor volt kapcsolva.



III. Eredmények

III.1. Szérum lipid vizsgálatok

A két hónapon keresztül 2 % koleszterin tartalmú diétán tartott állatok szérum koleszterin szintje szignifikánsan megemelkedett, kb. 20-40-szeresére a normál értéknek. A normál tápon élő kontrol állatok szérum összkoleszterin szintje 1.088 ± 0.066 mmol/l, míg a hiperkoleszterinémias nyulaké 32.860 ± 2.4 mmol/l volt.

III.2. Morfológiai változások az aortában és más szervek kisebb artériáiban /szív, vese/

A két hónapos diéta után elsősorban az aortában figyelhetünk meg súlyos elváltozásokat, melyek már szabad szemmel is jól láthatók az ér hosszanti felnyitása után. Szudánfekete vagy Oil Red O zsírfestékekkel megfestve még szembetűnőbbek a zsíros intimális vastagodások. Fénymikroszkóppal vizsgálva az aortán /2. kép/ kívül más, kisebb erekben is találunk zsíros intimális depozitumokat, mint pl. a szív koronáriáiban /3. kép/, vagy az a. renalisban /4. kép/. Elektronmikroszkópos metszeten habos sejteket látunk a zsíros depozitumokban, melyek makrofág, vagy simaizomsejt /SIS/ eredetűek. Az 5., 6. képeken SIS-habos sejtek láthatók óriási zsírcseppekkel a citoplazmájukban. A média mélyebb rétegeiben alig fordul elő zsírákkumuláció, ill. a sejtek egy része innét az intima felé vándorol, hogy ott vegye fel a lipoproteineket.

III.3. Morfológiai változások az agykérgi kapillárisokban

A kontrol állatok agykérgének ultrastruktúrája jól megőrzött, a sejtmagok nagy, halvány sejtmagvacskával rendelkeznek, a citoplazma riboszómákkal és egyéb sejtszervecskével gazdagon ellátott.

Folytonos membránokat találunk mind a sejtmag, mind pedig a citoplazma körül. Az erek endotélsejtjei laposak, intakt sejtkapcsoló struktúrák ("tight junction"-ok) kötik őket össze, ép "zonula occludens"-szel /11. kép/. Alattuk vékony, ép bazális membránréteg található, körülöttük pedig kicsi, lapos perivaszkuláris glianyúlványok láthatók /9.a., b., 10., 12. képek/. A koleszterin etetés hatására az agykérgi kapillárisok körül ödémás duzzanatok jöttek létre, melyek a félvékony metszeteken is láthatók /8. kép/. Elektronmikroszkóppal vizsgálva a kapillárisok abluminális felszínéhez tapadó gliatalpok jelentős duzzanatát figyelhetjük meg /14., 15., 16., 19. képek/. A neuronális és a gliális citoplazma duzzanata hatással volt a bennük található sejtszervecskékre is. A membrán-kötött organelleumok, pl. vezikulák, durva szemcsés endoplazmás retikulum és lizoszómák duzzadtak /17., 18. kép/. A riboszómák kiürültek a glianyúlványokból, így a citoplazma üresnek tűnik /14. kép/. A sejtmagokon nem látszanak változások. A bazális membránok alapvetően normálisak maradtak, csak helyenként fordult elő enyhe vastagodás, ill. rétegződés /16. kép/. Az endotélsejtek és a sejtek közötti szoros kapcsoló struktúrák általában jól megőrzöttek voltak. Egyetlen állat esetében koleszterin kristályokat találtunk az agykéregben az elektronmikroszkópos feldolgozás során /20.a.b. képek/. Természetesen semmiféle általánosító következtetést nem vonhatunk le ebből a VAG permeabilitására vonatkozólag, mindössze megemlítjük az előfordulását, ami feltehetően az állat egyéni érzékenységének, genetikai determináltságának a következménye. Az aortában sokkal gyakrabban találunk koleszterin kristályokat a plakkokban /David, 1967./.

III.4. LDL izolálás nyúlszérumból

A kis sűrűségű lipoproteint /LDL/ normál nyúlszérumból izoláltuk /1. ábra/. Kezdetben több állatból gyűjtött vér szérumával dolgoztunk. A kapott LDL frakció minőségét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, amellyel kiderült, hogy az LDL preparátumunk nem homogén. Többféle ultracentrifugálással történő izolálási módszert is kipróbáltunk, míg végül rátaláltunk a megoldásra. Ha egyetlen állattól származó szérumot használunk az izoláláshoz, tiszta LDL preparátumot nyerünk, amit az ELFO lemezen látható homogén csík bizonyít /22. kép/.

Az izolálást Terpstra /1981/ módszerének módosításával végeztük. A módosítás abból állt, hogy első lépésként kicentrifugáltuk a szérumból az összes lipoproteint, majd dializálás után a Terpstra által használt sógrádiensen elválasztottuk őket egymástól. Mivel a sógrádiensre egy besűrített lipoprotein keverék került a normál szérum helyett, így nagyobb mennyiségű LDL-hez jutottunk. A 21. képen látható a lipoproteinek szétválása ultracentrifugálás után. A festés Sudan black B-vel történt. Az LDL frakcióból ezután kidializáltuk a sókat, meghatároztuk fehérje tartalmát, és felhasználásig 4 °C-on tartottuk. Ha nem használtuk fel azonnal, sterilre szűrve max. 3 hétig tároltuk.

III.5. LDL felvétel vizsgálata

III.5.1. Izolált agykapilláris frakción

Az irodalomban leírt és használt agykapilláris preparálási módszerek nem feleltek meg számunkra, ui. nagyon csekély volt az élő sejtek aránya /tripánkéssel, ill. fluoreszcein-diacetáttal való festések alapján/.

Ezek a preparátumok nagyon tiszták, tehát kevés glia, neuron, stb. található bennük a kapillárisok mellett, és kitűnően alkalmasak enzimvizsgálatokra. Az endotélsejtek között az izolálási procedúrát követően is megtaláljuk a szoros kapcsoló struktúrákat. Jellemző azonban, hogy az endotélsejtek citoplazmája sok vezikulát tartalmaz, az organellek száma csökken és a citoplazma üresebbnek tűnik, mint intakt állapotban. A bazális membránt mindenütt megtaláljuk az endotélsejtek körül. Mivel mi a feltételezett LDL receptorokat akartuk kimutatni a kapilláris endotélben, és annak működését láttatni az arany jelzett LDL segítségével, jobb életképességgel bíró kapillárisokat igyekeztünk preparálni. Az izolálási metodikák módosításával olyan túlélő kapilláris frakciót nyertünk, melyen már volt esélyünk, hogy találunk lipoprotein receptorokat /26. kép/. A várakozással ellentétben azonban nem sikerült kolloidális arany szemcséket kimutatni az endotélsejteken, ill. sejtekben. Azonban a kapillárisokhoz tapadó gliasejteken, ill. az izolátumban előforduló egyéb sejtekben, vagy azok felszínén nagy számú aranyszemcse volt látható. Ezért felmerült a lehetőség, hogy a rendszer hibájából adódóan az LDL molekulák el sem jutottak a kapilláris endotélhez, mivel az ágas-bogas csőrendszer megakadályozta őket ebben /25. kép/.

III.5.2. In situ perfúzió arany jelzett LDL-lel

A kapilláris frakcióval kapcsolatos negatív tapasztalatok elkerülése végett, közvetlenül az artériás rendszerbe juttattuk a kolloidális arannyal jelzett LDL-t az arteria carotison keresztül. A másik ok, amiért a carotison keresztül juttattuk be a lipoproteint, hogy viszonylag kevés LDL állt rendelkezésünkre. Hogy a jelzett LDL ne adszorbeálódjon a vér alakos elemeihez, először 50 ml Krebs oldatot perfundáltunk keresztül az arteria carotison.

Az LDL beadásától számított kb. 10 perc után leállt a szívműködés és a légzés, ezért ennél hosszabb ideig nem tudtak a kapillárisok érintkezni az LDL-lel. Ezután perfundáltuk az állatot szintén az arteria carotison keresztül BSA tartalmú fiziológiás sóoldattal /a BSA az aspecifikus lipoprotein kötődések megszüntetése miatt volt szükséges/, majd Karnovsky fixálóval, és a kivágott szövetmintákat feldolgoztuk elektronmikroszkópos vizsgálatra. A kísérletet 5 hiperkoleszterinémias és 2 kontrol állaton végeztük. A nagy számú ultravékony metszet átvizsgálása nem hozott pozitív eredményeket, gyakorlatilag nem találtunk aranszemcséket a kapillárisok endotélsejtjeiben, ill. a glitálpakban.

III.5.3. LDL-felvétel vizsgálata fibroblaszt sejttenyészetben

Mivel az agykapillárisok esetében nem sikerült kimutatni LDL-felvételt, felmerült az a gondolat, hogy esetleg az LDL molekulákban történhetett valamilyen változás az izolálás során, ezért nem tud a receptorhoz kötődni. Ennek a feltevésnek a kizárása érdekében vizsgáltuk meg, hogyan viselkednek a nyúlfülből izolált fibroblasztok LDL jelenlétében. Az LDL hozzáadása előtt 24 órával lipoproteinmentes szérummal egészítettük ki a tápoldatot. Ezt követően az arany jelzett LDL-lel 60 percet inkubáltuk, majd gumidugó segítségével felkapartuk és összegyűjtöttük a sejteket /4 Petri csésze/, és beágyaztuk elektronmikroszkópos vizsgálatra. A 27. képen a fibroblasztsejtek által felvett LDL molekulákat demonstrálják a különböző vezikulákban, lizoszómákban látható aranszemcsék./Az alkalmazott Durcupan műgyanta rossz minősége miatt nem tudtunk vékony metszeteket készíteni./

III.6. Albumin permeabilitás vizsgálata

III.6.1. Arany jelzett albuminnal

Kolloidális arannyal jelzett BSA-t /24. kép/ injektáltunk két hiperkoleszterinémiás állatba intravénásan, majd 2 óra elteltével perfundáltuk őket a szív bal kamráján keresztül, és az agykérgi szövetmintákat feldolgoztuk elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára. A kapilláris endotél impermeabilis maradt az albuminnal szemben, nem találtunk arany szemcséket.

III.6.2. Evans késsel /EK/

Ez a festék a szérum-albuminhoz kötődve transzportálódik a vérben, és amennyiben az albumin átjut a VAG-on, a pirosan fluoreszkáló festék jelzi azt. A 2 kontrol és 2 hiperkoleszterinémiás állat agykérgéből készült fagyasztott metszeteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Ezzel a módszerrel sem tudtunk extravaszkuláris albumint kimutatni az agyban /29. kép/. Az agykéreg EK tartalmát fotometriás módszerrel is mértük. Ennek során 2 kontrol és 2 hiperkoleszterinémiás állatba juttattunk festékoldatot intravénásan, melyeket 3 óra múlva Krebs oldattal perfundáltunk. Az agy festéktartalmát ezután fotometriás módszerrel határoztuk meg. Az 1. táblázatból láthatjuk, hogy a két csoport agykérgi festéktartalma között nincs különbség, tehát nem nőtt meg az albumin-permeabilitás a hiperkoleszterinémiás nyulak esetében.

1. táblázat

Evans kék tartalom meghatározása kontrol és hiperkoleszterinémiás nyulak agyában

	kontrol, n = 2		hiperkoleszterinémiás, n = 2	
	μg festék/g nedves súly	szérum-CH mmol/l	μg festék/g nedves súly	szérum-CH mmol/l
agykéreg	0,97	1,19	0,90	18,2

III.6.3. Immunhisztokémiai módszerrel

A módszer segítségével az állat saját szérum albuminját mutatjuk ki, birkában termelt nyúl albumin ellenes szérum segítségével /ARGG/. A vizsgálatokat 4 állaton végeztük el, melyek közül 2 kontrol volt. Az egyik kontrol és az egyik hiperkoleszterinémiás állatot perfundáltuk, míg a másik kettőt nem. Ez utóbbi kettőt a célból nem, hogy a vérben levő albumin pozitív önkontrolt biztosítson /28. kép/.

Mindkét csoport esetében negatív eredményeket kaptunk, nem hagyta el albumin a vérpályát.

III.7. Víztartalom mérések

A két hónapos koleszterin etetést követően kis mértékű, nem szignifikáns emelkedést mértünk a víztartalomban a kísérleti állatok agyának különböző régióiban. A nedves/száraz módszer alkalmazásával perfundált és nem perfundált állatok esetében is elvégeztük a méréseket, melyeket az 2., 3., 4. táblázatokban tüntettünk fel. A perfúziót követően mért agyminták nedves súlya magasabb értéknek adódott, ebből következően a képlet alapján kiszámolt víztartalom értékek is magasabbak.

Mivel ez a hatás a kontrol és kezelt állatokat egyaránt érintette, és amúgy is az értékek hányadosát vesszük, nem pedig az adatok abszolút értékéből vonunk le következtetéseket, a két mérési eredmény összehasonlítható. A minket leginkább érdeklő minták, az agykérgi területek esetében nem tapasztaltunk víztartalom emelkedést.

2. táblázat

Perfundált agy különböző területeiről származó minták víztartalmának mérése nedves/száraz módszerrel /az értékek %-ban vannak megadva/

	kontrol n=3	hiperkoleszterinémias n=3
agykéreg	81,70	81,74
hipotalamusz	76,14	78,52
kisagykéreg	78,93	78,51
hippocampus	76,88	79,54
talamusz	74,82	75,98

n: állatok száma

A megadott értékeket állatonként 3-3 agyszövet darabka mérési eredményeinek átlagából számoltuk ki.

A kontrol állatok szérum-koleszterin értékei: 0,59; 0,58; 0,59 mmol/l, a koleszterin etetetteké: 41,2; 49,4; 47,3 mmol/l voltak.

Amennyiben a különböző agyi régiók víztartalmát átlagoljuk mindkét csoportban, már jelentősebb víztartalom emelkedést látunk a koleszterin etetett csoportban /3. táblázat/.

3. táblázat

Perfundált agy különböző régióiból vett szövetmintáinak összesített víztartalom értékei %-ban /2. tábl. alapján/

	kontrol n=3	hiperkoleszterinémias n=3
átlagolt agy-víztartalom	77,69	78,85

Ha csak az agykérgi minták víztartalmát hasonlítjuk össze, és ehhez a nem perfundált állatoknál kapott eredményeket is hozzávesszük, a 4. táblázatból láthatjuk, hogy nincs eltérés a kontrol és kezelt állatok között.

4. táblázat

Fiziológiás sóoldattal perfundált, ill. nem perfundált állatokból származó agykéreg minták víztartalmának mérési eredményei %-ban

	perfundált		nem perfundált *	
	kontrol n=3	hiperkoleszterinémiás n=3	kontrol n=2	hiperkoleszterinémiás n=2
agykéreg	81,70	81,74	77,53	77,57

* 4-4 agykéreg minta átlagértékei állatonként

A nem perfundált állatok szérum-koleszterin értékei a következők voltak: kontrol állatok: 1,3 ill. 0,9 mmol/l, koleszterin etetett állatok: 33,9 ill. 38,9 mmol/l.

III.8. Agysűrűség meghatározása

A sűrűség meghatározásokhoz az agykérgi szövetmintákat a frontális, illetve fronto-parietális lebenyből vettük. 7-7 kontrol, illetve koleszterin etetett állaton végeztük a méréseket, állatonként 3-3 szövetmintán. A Tengvar és mtsai /1982, 1983/ által leírt mikrogravimetriás módszer alapján Percoll grádiensen határoztuk meg az agydarabkák sűrűségét. Az agy sűrűsége és víztartalma egymással fordított arányú összefüggést mutat. Eredményeink /5. táblázat/ szerint a sűrűség értékekben kismértékű, nem szignifikáns csökkenés tapasztalható, ami korrelál az ugyancsak kismértékű víztartalom emelkedéssel.

5. táblázat

Különböző területekről származó agyszövet minták sűrűségének meghatározása mikrogravimetriás módszerrel, Percoll grádiensen

	kontrol n=7	hiperkoleszterinémiás n=7
agykéreg	* 457 ± 4,085	451 ± 4,336
hipotalamusz	450 ± 5,193	447 ± 3,914
kisagykéreg	463 ± 4,330	455 ± 4,396
hippocampus	456 ± 4,090	447 ± 4,205
talamusz	445 ± 4,231	448 ± 6,394

*hiper
dum*

* A táblázatban szereplő adatokat a következő képlet alapján számítottuk: /mért sűrűség átlag - 1/ × 10⁴ ± S_x

III.9. Szérum ozmolaritás mérése

13 db koleszterin etetett és 10 db kontrol állat szérum ozmolaritás átlagértékei azt mutatják /6. táblázat/, hogy a koleszterin etetés mem hozott létre szignifikáns változást a szérum ozmolarításban.

6. táblázat

Szérum ozmolaritás mérése kontrol és hiperkoleszterinémiás nyulakban

	Szérum ozmolaritás /mOsm/kg/
kontrol n=10	*300,3 ± 2,7
hiperkoleszterinémiás n=13	303,7 ± 3,2

* mérési eredmények átlagértékei ± S_x; minden szérum mintát 3x mértünk.

III.10. Az agy Na⁺ és K⁺ tartalmának mérése

A 7. táblázat adatai 3-3 mindkét csoportból származó állat esetében mutatják az ötféle agyterület K⁺ és Na⁺ tartalmát atomabszorpciós mérések alapján. A táblázatban feltüntettük a Na⁺/K⁺ arányt is, mely egyes agyterületek esetében kismértékű emelkedést mutat a koleszterin etetett csoportban.

7. táblázat

Kontrol és hiperkoleszterinémiás állatok különböző agyterületeinek K⁺ és Na⁺ tartalma

	Na ⁺		K ⁺	
	/ug/mg szárazsúly		/ug/mg szárazsúly	
	kontrol	hiperkoleszt.	kontrol	hiperkoleszt.
agykéreg	4,944	4,903	20,252	19,698
hipotalamusz	3,834	4,141	12,813	13,588
kisagykéreg	4,074	4,017	17,744	16,311
hippocampus	3,932	4,321	13,435	12,482
talamusz	3,596	3,678	12,822	10,974
	Na ⁺ /K ⁺			
	kontrol		hiperkoleszterinémiás	
agykéreg	0,244		0,248	
hipotalamusz	0,299		0,304	
kisagykéreg	0,229		0,246	
hippocampus	0,292		0,346	
talamusz	0,280		0,335	

Ugyanazon állatok agymintáiból történt a Na⁺ és K⁺ meghatározás, amelyeket a víztartalom meghatározáshoz súlyállandóságig szárítottunk, és amelyeknek a szérum koleszterin értékei a 2. táblázat alatt vannak feltüntetve.

III.11. Na⁺, K⁺-ATPáz aktivitás

A 8. táblázatban tüntettük fel a kontrol és 2 hónapos koleszterin diétán tartott állatok agykérgéből izolált kapilláris frakciók Na⁺,K⁺-ATPáz aktivitását. Mivel kisszámú mérési adat áll csak rendelkezésünkre, nem végeztünk statisztikai számításokat, azonban a táblázatból jól látható a koleszterin etetés hatására bekövetkező jelentős csökkenés az enzimaktivitásban.

8. táblázat

Agykérgi kapilláris frakciók Na⁺,K⁺-ATPáz aktivitása

	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPáz / μmol/mg/óra/	
	kontrol, n=4	hiperkoleszterinémias, n=3
kapilláris frakció	3,180	1,155

A kontrol állatok szérum-koleszterin értékei: 0,65; 0,89; 1,06; 1,30 mmol/l, míg a hiperkoleszterinémias állatok szérum-koleszterin értékei: 41,36; 42,23; 14,30 mmol/l voltak.

III.12. Adenilcikláz /AC/ aktivitás

4 kontrol és 4 koleszterin etetett /1 %, 2 hónap/ állat izolált agykérgi kapillárisainak enzimaktivitását mértük. Az eredményeket az 5. ábrán láthatjuk. Az emelkedett szérum koleszterinszint az enzim aktivitásának csökkenését eredményezte. Azonos szubsztrát koncentráció mellett kevesebb termék, azaz cAMP képződött a kontrolhoz képest.

Mindössze 2 állat esetében vizsgáltuk az enzim aktiválhatóságát hisztamin és noradrenalin hatására, izolált agykérgi kapilláris frakción.

A 6. ábrán látható oszlopdiaagrammon megfigyelhetjük, hogy a hisztamin és a noradrenalin mindkét csoportban fokozta az AC aktivitást, a koleszterin etetett állatok esetében azonban nagyobb mértékben.

III.13. Koleszterin/foszfolipid /CH/PL/ moláris arány a sejtmembránban

A 2 hónapig tartó koleszterin tartalmú diéta eredményeként nemcsak a szérum-koleszterin értékek szignifikáns emelkedése figyelhető meg a kísérleti állatokban, hanem a sejtmembránba beépülő koleszterin mennyisége, illetve aránya is nagyobb. Izolált agykérgi kapilláris frakcióban mértük a membrán koleszterin és foszfolipid tartalmát, valamint zsírsav összetételét. A CH/PL arány a várakozásnak megfelelően magasabbnak adódott, tehát több koleszterin épült be a sejtmembránba, mint a kontrol állatok esetében /9. táblázat/.

9. táblázat

A CH/PL moláris arányának változása koleszterin etetés hatására agyi kapillárisokban

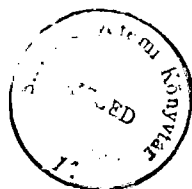
	kontrol n=3		hiperkoleszterinémiás n=5	
	CH/PL	szérum-CH mmol/l	CH/PL	szérum-CH mmol/l
agykapilláris frakció	0,415	1,24	0,627	36,51

A membrán zsírsav összetételében nem találtunk lényeges különbséget a 2 csoport között, mindössze annyit, hogy a koleszterin etetett csoportban kissé magasabb volt a telítetlen zsírsavak mennyisége, ami valószínűleg egy kompenzációs hatás a beépült koleszterin rigiditást okozó hatásával szemben.

IV. Megbeszélés

Munkánk eredeti célja a kis sűrűségű lipoproteinek, az LDL felvételének vizsgálata volt agykérgi kapillárisokon, kísérletes koleszterinszklerózisban. Majd az agykéreg elektronmikroszkópos vizsgálata során talált citotoxikus ödémának különböző módszerekkel történő bizonyításával foglalkoztunk. Az eredményeket a III. fejezet tagolódásának megfelelően tárgyaljuk.

Amint azt már a bevezetőben említettem, a diétás módszerekkel kísérletesen létrehozott ASC széleskörűen alkalmazott módszer a világon. Bár létjogosultságát sokan megkérdőjelezik arra hivatkozva, hogy egy növényevő állatot koleszterinnel etetni igencsak természetellenes, azonban ha arra gondolunk, hogy egyrészt a morfológiai elváltozások hasonlóak az emberéhez, másrészt, hogy sokak szerint az ember is növényi táplálékon tarthatja meg az egészségét, illetve hogy alapvetően a növényi tápanyagok feldolgozásához alkalmazkodott az anyagcseréje /Oláh A. 1985./, akkor el kell fogadnunk ezt a modellt. A nyolc hetes koleszterin etetés /1, ill. 2 %/ hatására az irodalmi adatoknak megfelelően /Duff, 1935./, szignifikánsan emelkedett a szérum koleszterin tartalma mind az 1, mind pedig a 2 %-os diétán tartott állatokban. A morfológiai elváltozások azonban a 2 %-os diétán élő állatok esetében voltak jelentősek a nagy és kisebb erekben egyaránt. Mivel a 2 %-os diéta igen hatékonyan bizonyult a betegség előidézésére és fenntartására, a kísérletek többségét ilyen körülmények között végeztük. A kivételesen előforduló, 1 %-os diéta mellett végzett kísérletek, más célú és jellegű munkák során kimaradt állatok felhasználása miatt történtek.



Az irodalomból és saját morfológiai vizsgálatainkból jól ismert, hogy a hiperkoleszterinémias nyúl aortájában, és kisebb artériáiban, pl. az a. renalisban, koronáriákban /Kritchevsky és mtsai, 1954./ zsíros depozitumok figyelhetők meg, melyet saját vizsgálataink is igazoltak /1-4 kép/. Mennyiségük és nagyságuk az alkalmazott diétától, ill. annak időtartamától függ. Az intrakraniális artériákban, i. az a. carotisban azonban nem jönnek létre ateroszklerotikus elváltozások /Vos és mtsai, 1983./. Chan és mtsai /1979/, valamint Morisaki és mtsai /1982/ vizsgálták az agyi kapillarisokat hiperkoleszterinémias nyulakban, és nem találtak morfológiai változásokat. Ellentétben a fenti két szerzővel, vizsgálataink során kismértékű morfológiai és biokémiai változásokat figyeltünk meg, illetve mértünk a hiperkoleszterinémias nyulakban.

Annak magyarázatát, hogy egy ilyen súlyos zsíryanycsere zavarban szenvedő állat agyi ereiben alig találunk elváltozásokat, talán elsősorban abban kell keresnünk, hogy a normál emlős agy érfali endotéliuma szerkezetében eltér más szervek endotéliumától /Majno, 1965./. Az agyi kapillarisendotélnek az evolúció során kifejlődött igen szelektív átteresztő képessége megvédi az agyat nemcsak a különféle anyagok mérgező hatásától, hanem pl. ez esetben a lipidek felszaporodásától, az ateromás plakkok kialakulásától is. Bizonyos területeket kivéve, az agyban nem találunk fenestrált endotéliumot /Lee és mtsai, 1971./. Más szervekkel ellentétben, az agyi erek nagyon kevés pinocitotikus vezikulát tartalmaznak /Cervós-Navarro, 1963./, és a mitokondriumok nagy száma jellemzi őket /Oldendorf és mtsai, 1981./.

Abban is különböznek más szervek endotéliumától, hogy a sejtek közötti kapcsoló struktúra - zonula occludens - nagyon szoros illeszkedést biztosít, helyenként fuzionál a két sejt citoplazmájának külső rétege /Brightman és mtsai, 1969./. A felsorolt különbségek következtében tehát az agykapillárisok endotéliuma működőképes marad, az agy intaktságát biztosító gátfunkciókat még ilyen körülmények /magas szérumszint/ között is megtartja. A szervezet más területein található endotélium, pl. az aortát bélelő sejtréteg átengedi az LDL molekulákat. Felgenhauer és mtsai /1980/ mutatták ki, hogy LDL-re létezik egy vércerebrospinális folyadék /CSF/ gát. Az agynak azonban szüksége van a különféle zsírokra, pl. a mielinhüvely felépítésére, ezért - bár korlátozott mértékben - fel kell vennie a lipoproteineket. Pardridge és mtsai /1980/ mérései szerint ez a felvétel nagyon kis mértékű /1 %/, tehát a gátfunkció /VAG/ fennáll lipoproteinekkal szemben.

A felújított inszudációs teória feltételezi az LDL mennyiségének növekedését az érfalban, és hogy az hatással van az endotélfal integritására. Némely szerzők /Ross és Harker, 1976./ szerint az intakt endotélium megvédi az érfalat az LDL beáramlással szemben, azonban ez a nézet nem egyezik azzal a ténnyel pl., hogy a normál humán artériákban is jelen van az LDL /Smith, 1980./. Poledne és mtsai /1986/ kimutatták, hogy extrakraniális artériák esetében az ateroszklerózis progressziója együttjár az érfal LDL felvételének növekedésével. Ők is megállapították, hogy nem csak a sérült artériákba, hanem a kontrol állatok intakt artériáiba is beáramlanak az LDL molekulák. A transzcelluláris transzportot, melynek segítségével az intakt artériákba jutnak az LDL molekulák, Vasile és Simionescu fedezték fel /1983/.

Az agy víztartalmát és sűrűségét azért mértük a két állatcsoportban, hogy a citotoxikus ödéma létét nemcsak morfológiai, tehát kvalitatív, hanem kvantitatív módszerekkel is bebizonyítsuk. A víztartalomnak nedves/száraz módszerrel történő mérése csak durvább elváltozások esetén, tehát sokkal nagyobb víztartalombeli különbségek kimutatására alkalmas módszer, amivel esetünkben nem is sikerült jelentős különbséget találni a csoportok között. A sokkal finomabb elváltozások kimutatására alkalmas, jóval érzékenyebb mikrogravimetriás mérési módszer segítségével kismértékű, bár nem szignifikáns csökkenést találtunk a sűrűség értékekben, ami enyhe víztartalom emelkedésnek felel meg. Pontosabban az értékek a víztartalom emelkedése felé tendálnak. Ilyen sűrűség méréseket már több, mint 50 éve végeznek, hogy a szöveti komponensek elváltozásait detektálják. 1924-ben Barbour és Hamilton használt xilént és brómbenzolt a vér sűrűségének mérésére, majd Linderstrøm-Lang /1937/ módosította ezt a módszert oly módon, hogy folyamatos grádienst készített kerozinból és brómbenzolból. Az agyödéma mérésére az SG használatát 1971-ben írták le /Nelson és mtsai, 1971./. Ma már elterjedt a használata, mivel nem nehéz módszer és kis szövetmintákat lehet használni. Citotoxikus ödémát hozhat létre a szérum ozmolaritásának megváltozása is, ezért 23 állat esetében ezt a paramétert is megmértük. Eredményeink egyértelműen kizárják ezt a lehetőséget, ui. nem találtunk szignifikáns különbséget a két állatcsoport között. A citotoxikus ödéma okát keresve mértük az agykérgi kapilláris frakcióban a Na^+ , K^+ -ATPáz, valamint az adenilcikláz enzimek aktivitását. Klatzo /1967/ megállapítása szerint citotoxikus agyödémáról akkor beszélünk, amikor a VAG permeabilitása többnyire normális, de az agy sejtés elemei duzzadtak.

Úgy hiszik, hogy ez a sejtmembránban működő aktív ionpumpák zavarának eredménye, ill. az ezt követő Na^+ felvételé és K^+ veszteségé. Kezdetben a sejtek megduzzadnak az intersticiális folyadéktérfogat többlete miatt, amely a folyadékterek eltolódásához vezet az agyon belül, azonban nem jön létre nettó víztartalom növekedés. Hossmann /1976/ véleménye szerint, ha a sejt Na^+ pumpája nem működik, a Na^+ az agyi intersticiális folyadékból az agysejtekbe kerül, melynek következtében gradiens jön létre a Na^+ diffúziójához a vérből az agy felé. Más kutatók szerint a Na^+ aktív transzportja a vérből az agyba - az agykapillárisokon keresztül - specifikusan stimulált az isémia korai fázisában /Gotoh, 1985./. Lo és mtsai /1987/ azt tapasztalták, hogy egyoldali agyi isémia létrejöttékor az emelkedett agyi víz és Na^+ tartalom nem annak a következménye, hogy megnőtt volna a VAG permeabilitása Na^+ -ra a 3 órás isémiás periódus végére, sőt szignifikáns csökkenést találtak a Na^+ permeabilitásban, hanem a leadás mértéke csökkent /4. ábra Lo cikkéből kölcsönözve/. A Na^+ agyba való bejutását különböző transzportrendszerek mediálják. Először az agykapillárisok endotélsejt membránja engedi át a Na^+ -ot, amelyet azután a sejt aktívan pumpál ki az agyba. Ez utóbbi lépést mediálja a Na^+ , K^+ -ATPáz, amelyről úgy hiszik, hogy a legtöbb sejtben 3 Na^+ iont 2 K^+ ionra cserél ki. Az endotélsejtbe került K^+ ion azután koncentráció gradiensén keresztül távozhat akár a vérbe, akár az agyba. A kettős Na^+ transzportot követi a klorid ioné, hogy az elektroneutralitás fennmaradjon, és a vízé az izozmolaritás érdekében. Annak ellenére, hogy folyamatos vízbeáramlás van, az agy térfogata normális körülmények között állandó marad. Ez jelzi a folyadék eltávolító mechanizmusok jelenlétét.

Ha az agykapillárisok által szekretált folyadék eltávolításában csökkenés áll be, az agyödémához vezet. Elképzelhető, hogy a koleszterin etetés hatására a vérben kialakult hipoxia eredményeként a fentiekhez hasonlóan megnövekszik a Na^+ aktív transzportja a vérből az agy felé. Mivel azonban a Na^+ és a víz eltávozása csökkent mértékű /Lo és mtsai, 1987./, az agyban megemelkedik a Na^+ és víztartalom, létrejön a citotoxikus ödéma. Ebben a fázisban a VAG permeabilitása szérumfehérjékre változatlan. A kezdeti stimulált Na^+ -pumpa aktivitása a továbbiakban feltehetően lecsökken, és mi már ebben a fázisban, két hónappal a koleszterin etetés kezdete után mértük az enzimaktivitást. Ha az ATPáz aktivitásában nem következik be a feltételezett kezdeti aktivitás növekedés, a citotoxikus ödéma akkor is létrejöhet. Ui. ha a Na^+ és víz eltávozása gátolt az agyból, akkor a csökkent pompa működés mellett is kialakul az ödéma. Bersohn és mtsai /1982/ a Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitásának szignifikáns csökkenését figyelték meg isémiás nyúl szívből izolált szarkolemma vezikulákon. Goldberg és mtsai /1985/ hasonló eredményekről számoltak be agyi isémiát követően. Az in vitro koleszterinnel dúsított patkány máj plazmamembrán preparátum is csökkent Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitást mutatott a kontrolhoz képest /Yahuaca és mtsai, 1985./. Rövid ideig tartó agyi isémiára esetén Yatsu és mtsai /1975/ is megfigyelték a Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitásának csökkenését.

Az általunk mért csökkent ATPáz aktivitást magyarázhatja a csökkent membránfluiditás is. Az agyi Na^+ , K^+ -ATPáz működéséhez megfelelő foszfolipid környezetre van szükség a membránban /Simpkins és Hokin, 1973., Stahl, 1973./, az enzim érzékeny a membránfluiditás változásaira /Grisham

Alam és mtsai /1987/ 1 és 2 % koleszterin tartalmú diétán tartott patkányok állkapocs alatti nyálmirigyeiben vizsgálták a Na^+ , K^+ -ATPáz és az adenilcikláz enzimek aktivitását, valamint a membránfluiditást. A CH/PL hányados szignifikánsan magasabb volt a hiperkoleszterinemiás állatokban az 1 és 2 %-os diéta esetében egyaránt. A Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitás szignifikánsan csökkent a 2 %-os diétán nevelt állatoknál, míg az 1 %-os diétán tartottak esetében nem volt változás. Az adenilcikláz enzim alapaktivitásában nem találtak különbséget, azonban ha fluoriddal, vagy izoproterenollal aktiválták az enzimet, mindkét hiperkoleszterinemiás csoportban csökkent aktivitást mértek a kontrolokhoz képest.

Kísérleteinkben mi is vizsgáltuk az AC enzim stimulálhatóságát. A hisztamin és noradrenalin egyaránt stimulálta az enzimet mindkét állatcsoportban /6. ábra/. Több szövetben kimutatták, hogy a plazmamembránba in vitro beépült koleszterin gátolta az adenilcikláz aktivitást /Whetton és mtsai, 1983., Scarpace és mtsai, 1985./, ill. egyes szerzők szerint aktiválta /Leoni és mtsai, 1982./. Scarpace és mtsai /1985/ feltételezték, hogy a membránba való koleszterin beépülés az enzim katalitikus egységének aktivitását csökkenti anélkül, hogy befolyásolná a hormonjel továbbítását.

A sejtmembrán foszfolipid komponenseinek integritása szükséges a receptor mediálta adenilcikláz aktivitás teljes kifejeződéséhez /Hebdon és mtsai, 1981./. Dux és mtsai /1984/ krónikus hipoxiát hoztak létre patkányban /napi nyolc óra hipobar hipoxia 30 napon keresztül/, melynek eredményeként szignifikánsan megemelkedett az adenilcikláz aktivitás az izolált agyi kapillárisokban.

Bár ez az eredmény ellentétes az általunk és mások által is mért adenilcikláz aktivitás csökkenéssel /5. ábra/, mégis elképzelhető, hogy különböző állatmodellek esetében a különböző idejű és mértékű hipoxia eltérő hatással legyen az enzimaktivitásra. További vizsgálatok szükségesek tehát a probléma tisztázására.

Két munkacsoport is megfigyelte, hogy szabadgyökök hatására csökken az agyi kapillárisok Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitása /Kovachich és mtsai, 1981., Lo és mtsai, 1986./. Chan és mtsai /1985/ kimutatták, hogy a szabadgyökök képesek citotoxikus agyödémát indukálni. Mivel ismeretes, hogy érelmeszesedésben megnövekszik a szabadgyökök mennyisége a vérben /Goto, 1982./, elképzelhető, hogy emiatt vagy emiatt is csökkent az agyi kapillárisok Na^+ , K^+ -ATPáz aktivitása a hiperkoleszterinémiás állatokban.

Összevetve eredményeinket az irodalmi adatokkal megállapíthatjuk, hogy az irodalom egy részével egyezően, a hiperkoleszterinémiás állatokban csökkent az izolált agyi kapillárisok membránfluiditása, valamint a Na^+ , K^+ -ATPáz és az adenilcikláz enzimek aktivitása. Az enzimaktivitás csökkenésének okozója lehet a membránfluiditás csökkenése, és a magas vérzsírszint következtében kialakuló hipoxia.

Bár az általunk alkalmazott állatmodellen nem sikerült kimutatni az agyi erek ateroszklerózisát, azonban ez nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy az állatokat mindössze két hónapig tartottuk ezen a diétán. A diéta időtartamának növelésével feltehetően emelkedne az elváltozások száma, mint ahogy a humán agyi elváltozások is inkább az idősebb korosztályt sújtják.



Bihari-Varga és mtsai /1981/ pl. koronária, agyi és perifériás érbetegségben szenvedő betegekben hasonlították össze a HDL-t és a HDL/összkoleszterin arányt /440 fő/, és a legalacsonyabb értékeket az agyi érbetegségekben szenvedőknél mérték. Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy összefüggés van a szérum lipoprotein összetétele és az agyi érbetegségek között.

Visszatérve az állatmodellhez, a továbbiakban a normál nyúlszérumból történő LDL izolálás nehézségeit szeretném ismertetni. Kezdetben az LDL preparáláshoz több nyúlból származó vért, illetve kevert szérumot használtunk. Ezek az LDL preparátumok nem voltak homogének az agaróz gél-ELFO vizsgálat szerint, és eleinte nem is tudtuk eldönteni, miből adódik ez az inhomogenitás. Úgy gondoltuk, hogy az LDL-n kívül más LP-k is kerültek a preparátumba, melyek elektroforetikus mobilitása csak alig különbözik az LDL-étől. Ezért többféle izolálási metodikát is végigpróbáltunk, hasonló eredménnyel. Egyik alkalommal elvéreztettünk egy állatot, amelyből bőséges mennyiségű szérum gyűlt össze az LDL izoláláshoz, így nem kevert szérummal dolgoztunk. A kapott LDL preparátum homogén volt. Ezért a továbbiakban mindig egyetlen állat szérumát használtuk fel lipoprotein izolálásra. Problémát jelentett még az izolált LP kis mennyisége, ui. a perifúziós kísérletekhez, valamint az in vitro kísérletekhez is meglehetősen nagy mennyiségű LDL-re volt szükségünk. A szérum egylépéses sűrűség grádiens ultracentrifugálásával viszonylag kis mennyiségű LDL-t nyerhettünk. Ha azonban első lépésként az összes LP-ket kicentrifugáltuk a szérumból, majd ezt a LP sűrítményt választottuk aztán szét alkotóira egy sűrűség grádiensen, nagyobb mennyiségű tiszta LDL-hez jutottunk, tehát megnőtt a kitermelés határfoka.

A különféle kísérleti eredmények azt valószínűsítik, hogy egyetlen közös kiváltó tényező hozhatja létre az általunk talált legkülönbözőbb elváltozásokat, és ez a hipoxia. Az érfali hipoxiát jelentős faktornak tartják az aterogenezisben. Hueper már 1944-ben feltételezte, hogy az ateroszklerotikus degeneráció kiváltó tényezője a hipoxia. Állatkísérletekben, melyeket többnyire nyulakon végeztek kimutatták, hogy a hipoxiás körülmények növelhetik az ASC súlyosságát /Kjeldsen, 1968., Helin, 1969., Okamoto, 1983./, és hogy a hiperoxia a plakk-képződés reverzióját okozhatja /Kjeldsen, 1969, 1970., Vesselinovitch, 1974./. A WHHL /Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit/, amelyekből genetikailag hiányoznak az LDL receptorok és az állatokban születésüktől fogva hiperlipémia fejlődik ki, kimutatták, hogy a szisztémás hipoxia elősegíti az aorta ateroszklerózist anélkül, hogy további koleszterinszint emelkedés történne a plazmában /Okamoto, 1983./. Számos közlemény jelent meg azzal kapcsolatban, hogy a koleszterinnel etetett állatokból származó szérumban koleszterin-akkumulációt indukál a különböző szövettenyészeteken /Chen, 1977., Bates, 1976., St.Clair, 1978., Pearson, 1976., Warhurst, 1981./. Nagyon fontos, hogy jobban megismerjük és megértsük az érfalba történő oxigén transzportot és az azt befolyásoló tényezőket. Az ép artéria két forrásból nyeri az oxigént és a tápanyagokat: az adventíciát és a média külső részét a vasa vasorum, míg az intimát és a média felső részét az ér lumenjéből be-diffundáló anyagok látják el /Woerner, 1959., Adams, 1964./. Az érfal oxigén ellátásának mélysége diffúzió által meglehetősen korlátozott, így intimális vastagodás, ateroszklerózis esetén az ellátás nem megfelelő /Kirk, 1955./.

Az in vitro eredmények azt mutatják, hogy a legfontosabb tényező a plazma rétegeken keresztüli diffúzió /Huxley, 1981., Holland, 1985., Yamaguchi, 1985./. A plazma rétegeken keresztüli diffúzió mértéke függ a vörösvértestek által szállított oxigén mennyiségétől, az oxigén telítési görbe alakjától és az oxigén diffúziós koeficiensétől. Ha olyan változások következnek be a plazma összetételében, amelyek csökkentik a diffúziós koeficiensst, az oxigén továbbítás mértéke a vörösvértestekből az érfal felé, ugyancsak redukálódni fog, okozva ezáltal egy hosszabb - rövidebb hipoxiát. Amennyiben emelkedik a protein /Navari, 1971./ vagy a glükóz szint /Gainer, 1973./ a plazmában, az szignifikánsan csökkentheti a diffúziós koeficiensst. Mivel sokféle változás bekövetkezhet a plazma összetételében természetes körülmények között, amelyek csökkenthetik a diffúziós koeficiensst, így fokozatos csökkenést eredményezhetnek a vérből kioldott oxigén mennyiségében. Az oxigén tenzió mérése normál nyulak aortájában kimutatta, hogy az a médiában volt a legalacsonyabb, és éles emelkedés volt megfigyelhető közvetlenül az endotél alatti területeken /Ninikowski, 1973./. A korai zsíros léziók jelentősen megzavarják az intimán keresztüli oxigén diffúziót /Heughan, 1973./. Martin és mtsai 1942-ben kimutatták, hogy a vörösvértestek kevesebb oxigént vettek fel a hiperkoleszterinémiás nyulak esetében. Kuo és Joyner /1957/ megfigyelte, hogy néhány IHD-s betegnél egy zsíros étkezés után, a szérum lipémia csúcspontján anginájuk volt. Ez a posztlipémiás angina gyorsan enyhült iv. heparin hatására /Kuo, 1957./. Hörcsögökön végzett kísérletek, ahol platina elektródokat helyeztek el az agyban, kimutatták az oxigén csökkenését az agyszövetben magas zsírtartalmú táplálék fogyasztása után.

Vajzsíroknak /tejszín/ erősebb hatásuk volt, mint a telítetlen zsíroknak /Engelberg, 1956./. Egyes szerzők feltételezték, hogy az oxigén diffúziója csökken a plazma globulinok szintjének emelkedésével, mely utóbbiak plazma szintje az életkorral nő /Navari, 1971., Chisolm, 1971./. Chisolm és mtsainak /1972/ eredményei megerősítették azt a hipotézist, hogy az emelkedett plazma protein koncentrációk csökkentették az oxigén diffúziót. Így a vörösvértetekbe diffundáló oxigén mennyiségének csökkenése az arteriális oxigéntenzio csökkenéséhez vezethet, valamint egy korral összefüggő, mérsékelt érfali hipoxiához, annak ellenére, hogy az alveoláris oxigénszint állandó marad. Boxen /1985/ arra hívja fel a figyelmet, hogy azok a faktorok, melyek szoros összefüggésben vannak az ASC-sal, mint az öregedés, dohányzás, hipertenzió, diabétesz és hiperkoleszterinémia /Solberg, 1983./, a hipoxiával is összefüggésben vannak. Kimutatták pl., hogy diabéteszben alacsonyabb a vér oxigén tenziója /Ditzel, 1979./, ill. az érfalon keresztüli oxigén tenzió is redukált /Railton, 1983./. Hipertenzióban az artériafal oxigén igénye megnövekszik /Ganfield, 1971./, így a magas vérnyomás hipoxiás körülményeket hozhat létre. Kutyákban azt találták, hogy a hipoxia vazokonstriktor anyagok felszabadulásához vezethet az endotélsejtekből /Rubanyi, 1985./. Hipoxia hatására az érfali prosztaciklin termelés emelkedését mértük patkányokon /Makary és mtsai, 1987./, amely emelkedés egy védekező mechanizmus része az ateroszklerózis kialakulásával szemben.

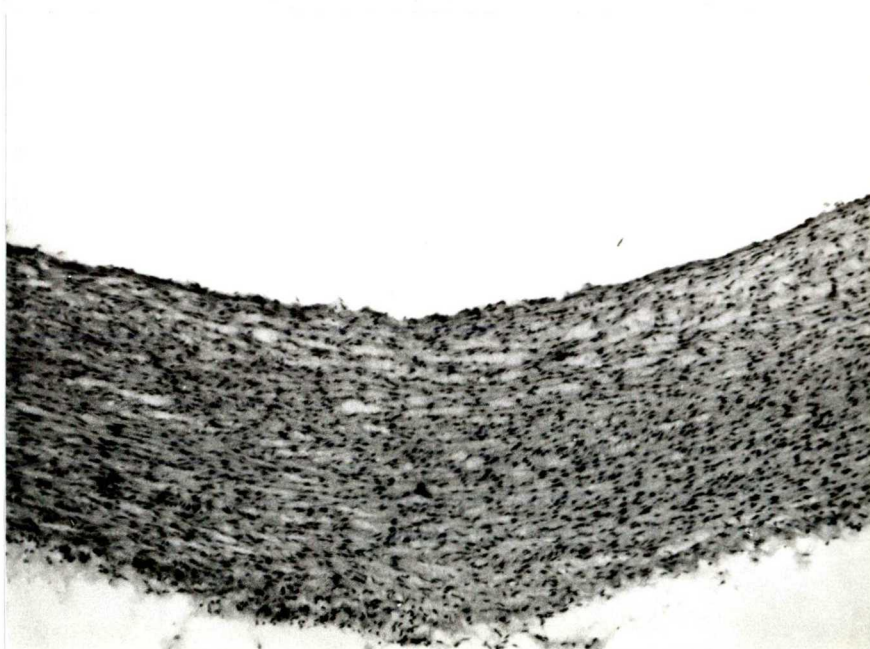
Hipoxia hatására a lipoprotein felvétel is fokozódik az érfalban, amely fokozza az érintett sejtek anyagcsere igényét, és ezáltal súlyosbítja a hipoxiát /Getz, 1969./.

Így a hipoxia elősegíti ezt a circulus vitiosust, amely az ateroszklerotikus plakk önfenntartó növekedését eredményezi. Az idézett irodalmi adatok bizonyítják, hogy a hipoxiának komoly szerepe van a testszerte kialakuló ateroszklerotikus elváltozásokban, ami alól az agyi erek sem kivételek. Linsenmeier és mtsai /1984/ vizsgálatai szerint a hipoxiának nem direkt hatásai vannak a sejtekre, hanem az extracelluláris K^+ koncentráció megváltoztatásán keresztül hat azokra. Roncali és mtsai /1985/ csirke embriók agyát vizsgálták krónikus hipoxiát követően, és a kapillárisok körül elhelyezkedő gliatalpák ödémás elváltozását írták le.

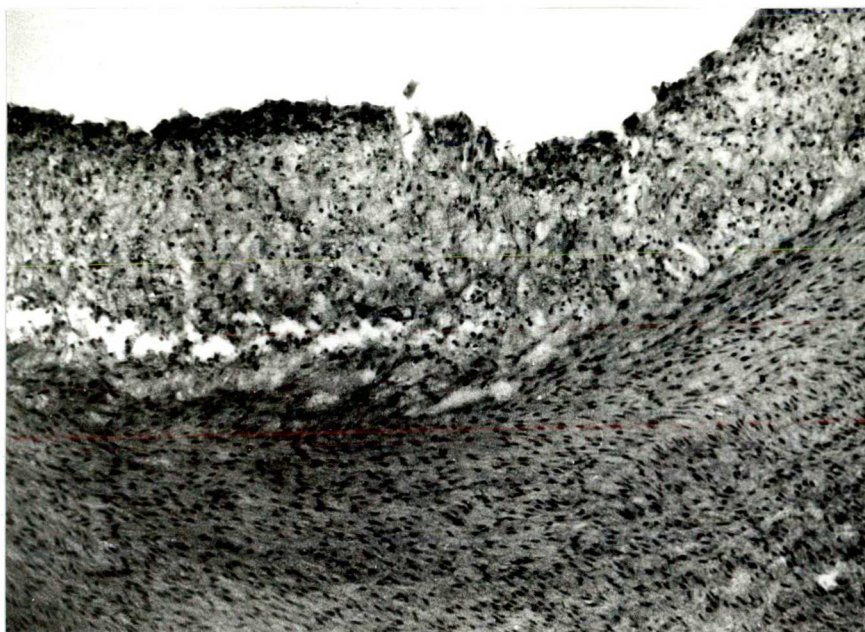
Összefoglalás

- 1./ Sikerült homogén LDL preparátumot előállítanunk nyulszérumból.
- 2./ Az LDL kitermelés határfokát javítottuk Terpstra módszerének módosításával.
- 3./ Citotoxikus agyödémát írtunk le nyúl agykérgi kapillárisaiban koleszterin etetés hatására.
- 4./ Vizsgálataink szerint a nyolc hetes koleszterin etetés nem károsítja a vér-agy gátat.
- 5./ A kísérletesen létrehozott koleszterin-szklerózisban az agykapillárisokban mért adenilcikláz és Na^+ , K^+ -ATPáz enzimek aktivitása csökkenő tendenciát mutat.

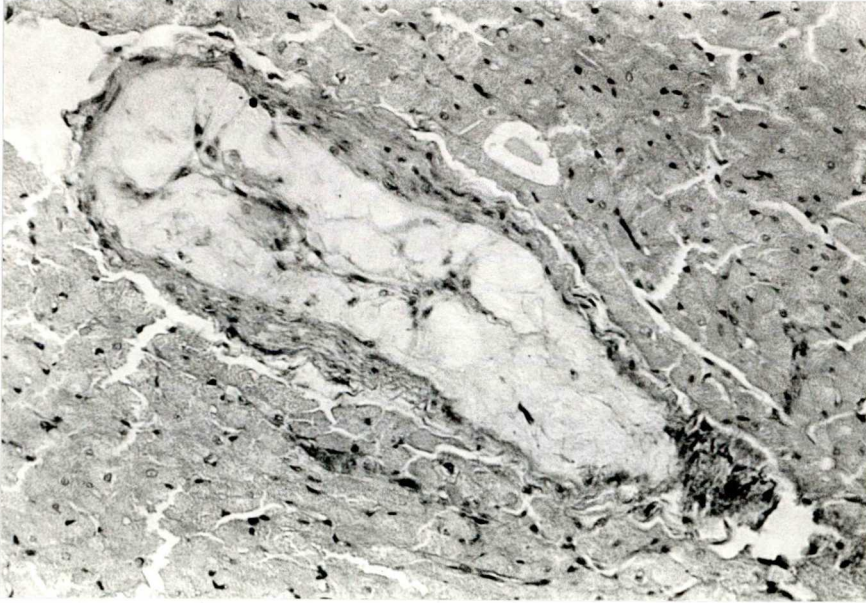
FÜGGELÉK



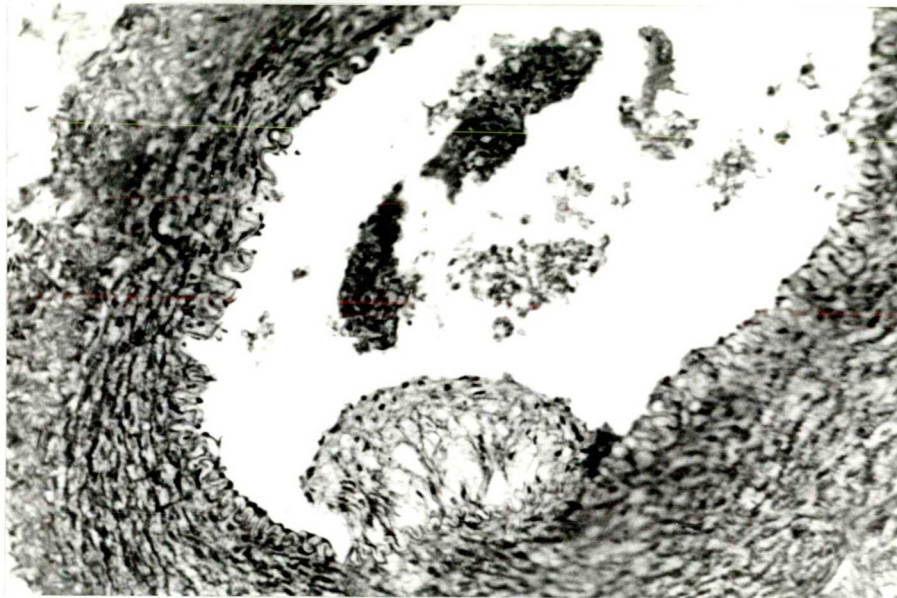
1.kép. Kontrol nyúl aorta részlet. Fagyasztott metszet, Oil Red O festés. 200 x.



2.kép. Hiperkoleszterinémias nyúl aortája, habos sejtes intima lézióval. Fagyasztott metszet, Oil Red O festés. 360 x.



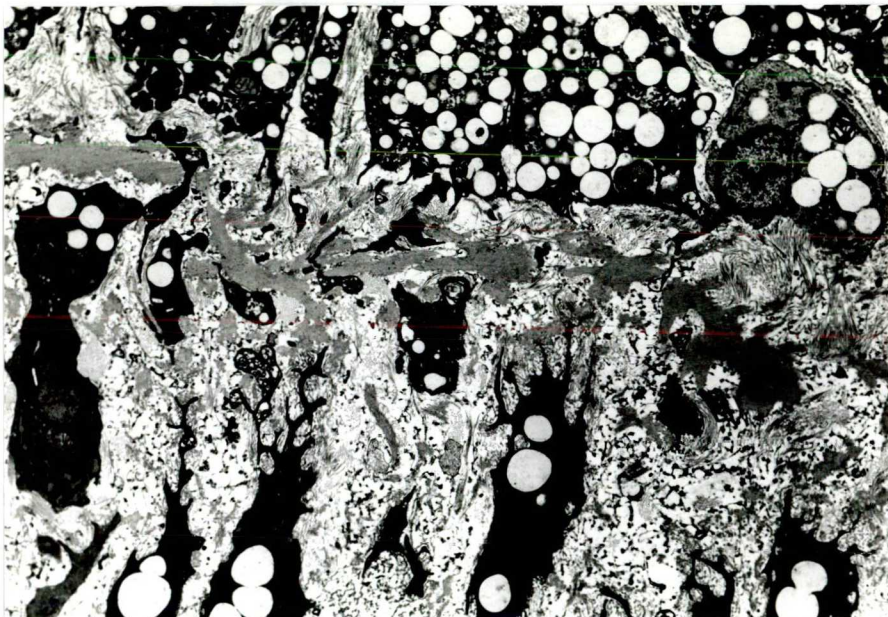
3.kép. Habossejtes lézió egy hiperkoleszterinémiás nyúl koszorús erében; haematoxilin eozin festés. 1800 x.



4.kép. Zsíros depozitum az a. renalisban hiperkoleszterinémiás nyúlból, Van Gieson-f. festés. 250 x.

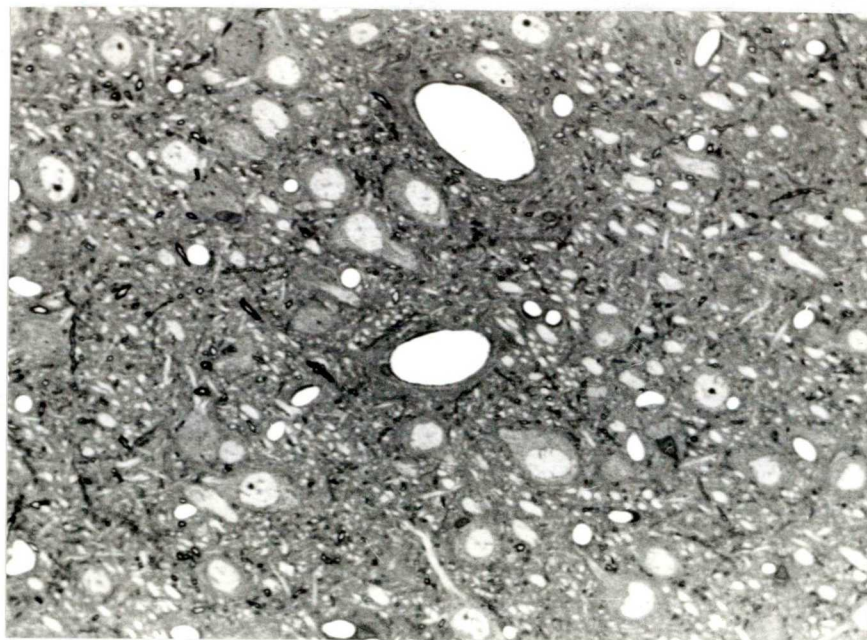


5.kép. Elektronmikroszkópos felvétel hiperkoleszterinémias nyúl aortájából. A média simaizomsejtjei lipideket halmoznak fel citoplazmájukban és felfelé vándorolnak az intimába. 3500 x.

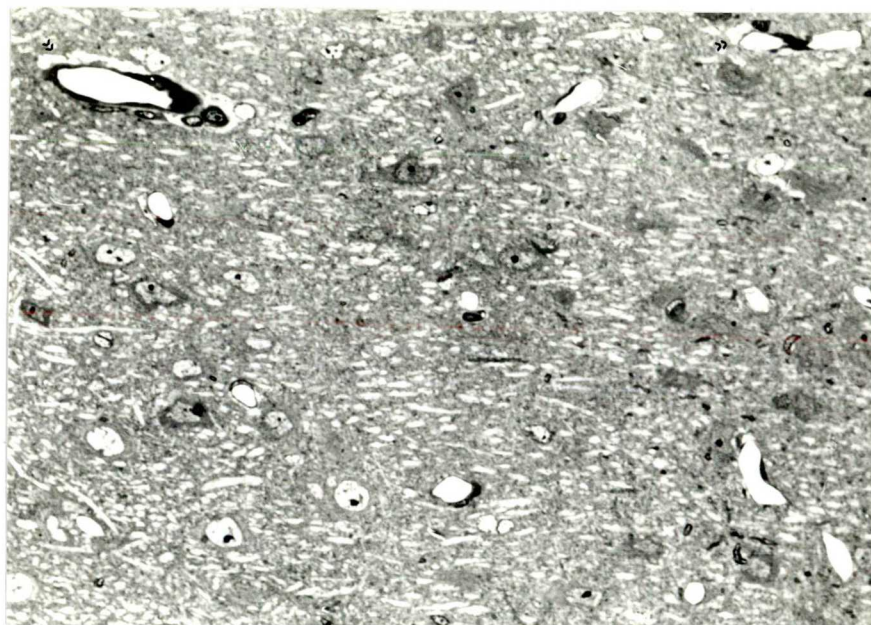


6.kép. Az 5. képen látható aortának egy intimához közelebbi részlete, ahol már igazi simaizomsejt-habos sejteket láthatunk. 3300 x.

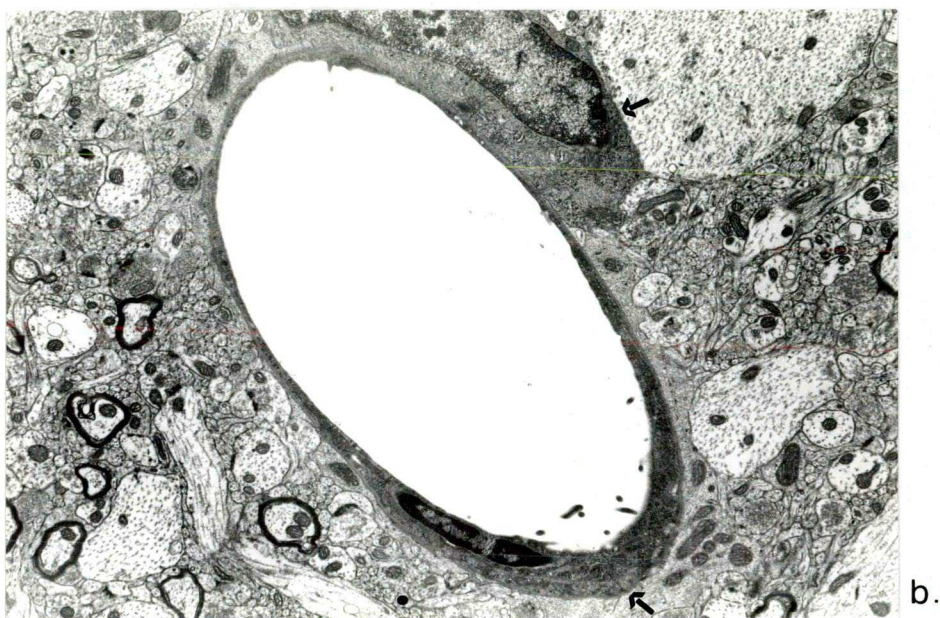
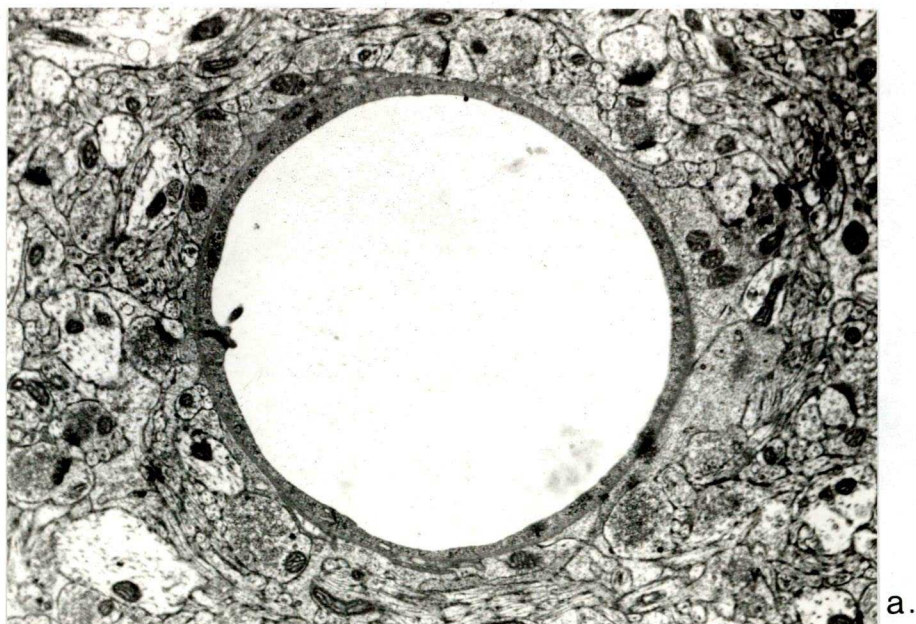




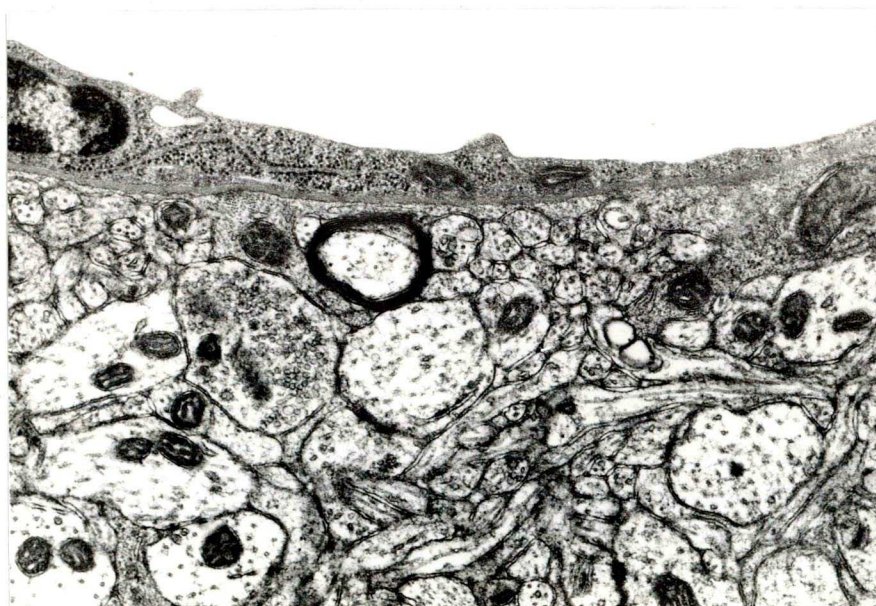
7.kép. Kontrol nyúlból származó agykéreg részlet félvékony metszeten; toluidinkék festés. 460 x.



8.kép. Hiperkoleszterinémias nyúl agykérgi részlete félvékony metszeten, ahol helyenként ödémás elváltozás látható a mikroerek körül; toluidinkék festés. 400 x.



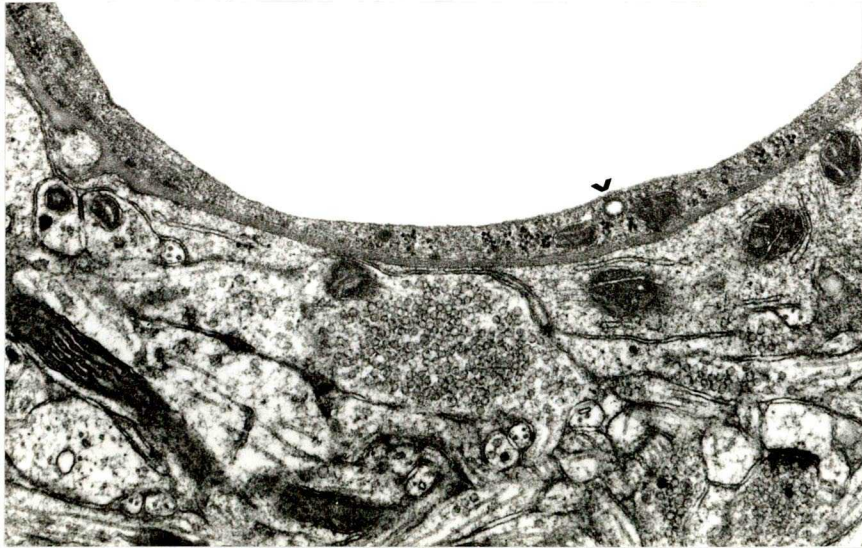
9.kép. a./, b./ Kontrol nyúl agykérgi kapillárisa, ahol a nyilak pericitákat ábrázolnak; a./ 8400 x. b./ 5000 x.



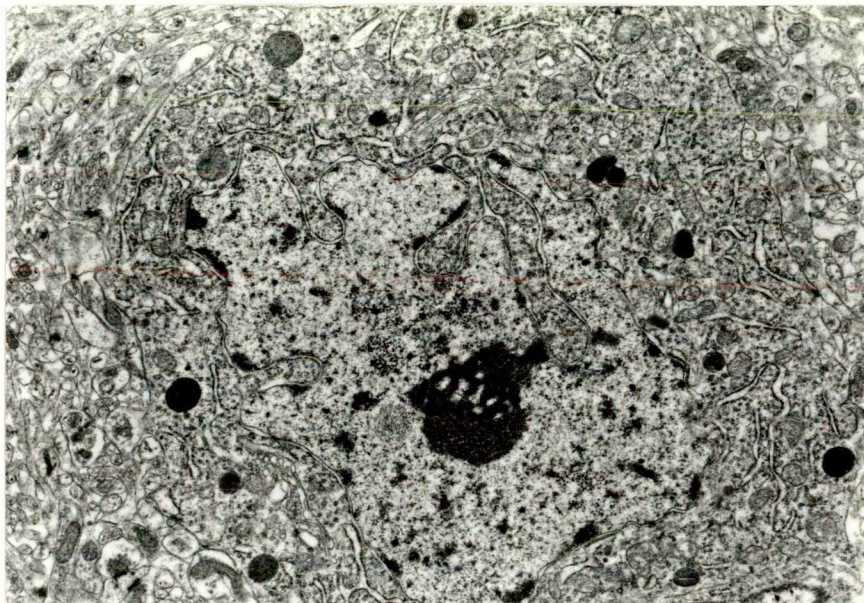
10.kép. Normolipémiás házinyúl agykapillárisának részlete; az endotélsejtben jól láthatók a mitokondriumok és a granulált endoplazmás retikulum. 19000 x.



11.kép. Kapillárisrészlet kontrol nyúl agykérgéből, ahol az endotélsejtek közötti szoros kapcsoló struktúra látható. 34000 x.



12.kép. Normolipémiás nyúl agykérgi kapillárisa, ép bazális membránnal, a citoplazmában burkos vezikulával /nyíl/. 20500 x.



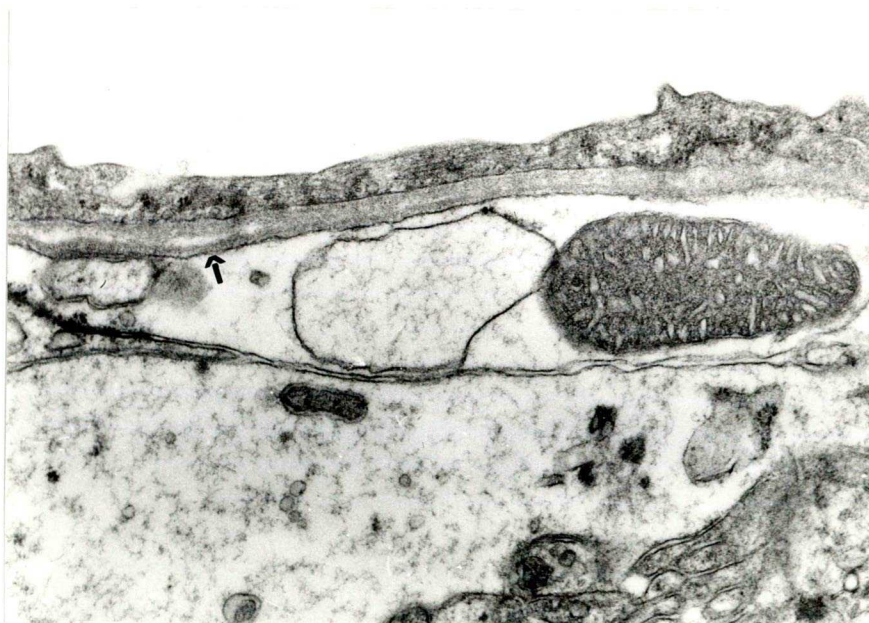
13.kép. Neuron részlet normolipémiás nyúl agykérgéből. 8400 x.



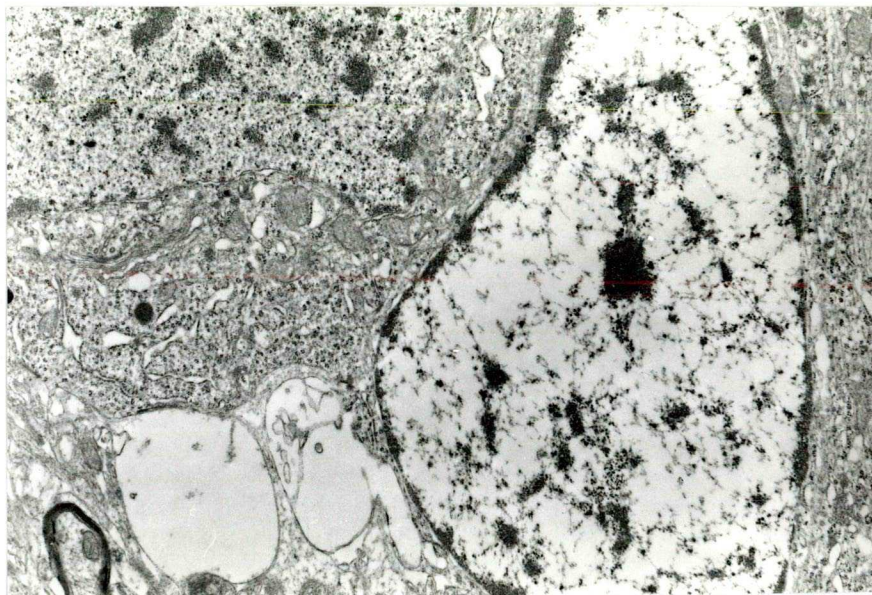
14.kép. Hiperlipémiás nyúl agykérgi kapillárisa, körülötte duzzadt gliatalpak. 9100 x.



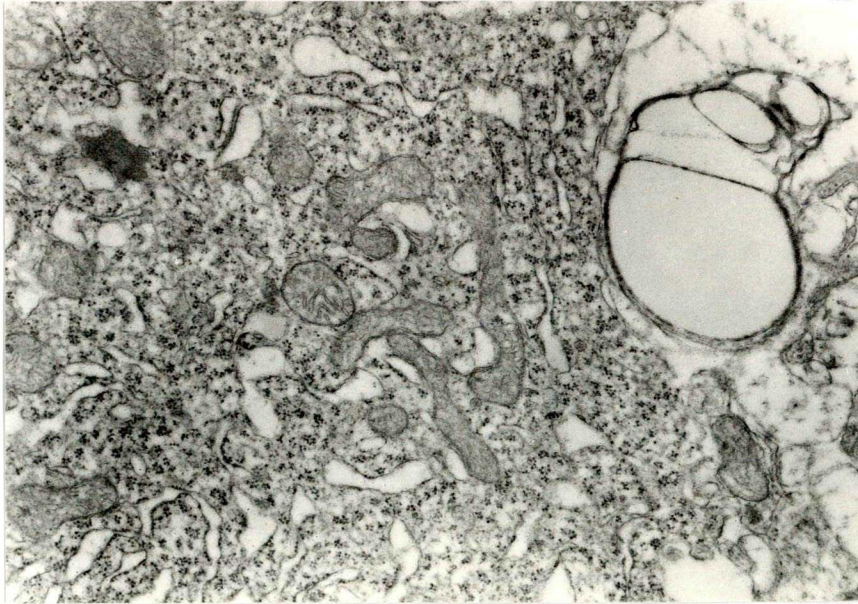
15.kép. Kapillaris körüli gliaduzzanat nagyobb nagyításban; az endotélsejtekben a kontrolhoz hasonlóan sok mitokondrium található. 27200 x.



16.kép. Hiperkoleszterinémias nyúl agykérgi kapillárisát ölelő duzzadt gliatalp, ép mitokondriummal; a bazális membrán helyenként enyhén megvastagodott és rétegesse vált /nyíl/. 21600 x.



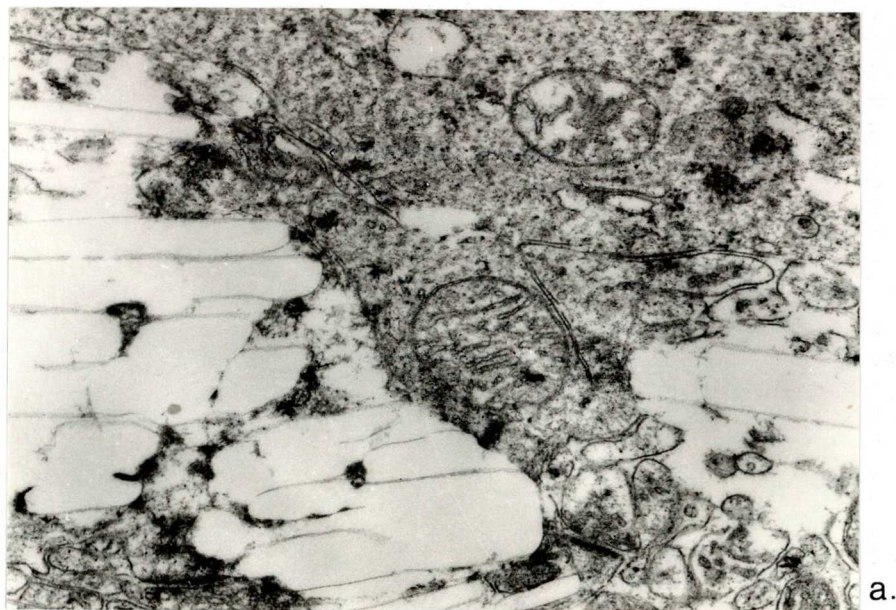
17.kép. Helyenként a neuronok körül is ödémás elváltozások figyelhetők meg a hiperkoleszterinémias állatok agykérgében. 8800 x.



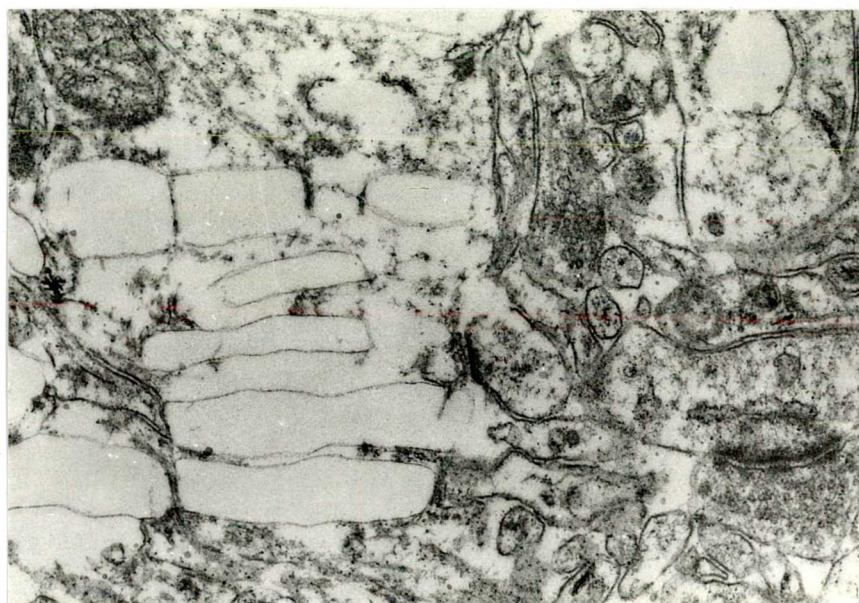
18.kép. Egy idegsejt körüli ödémás duzzanat hiperlipémiás nyúl agykérgéből; látható, hogy az endoplazmás retikulum is duzzadt. 15400 x.



19.kép. Agykérgi kapilláris hiperlipémiás nyúlból; a gliatalpak citotoxi-
kus ödémája látható. 16000 x.

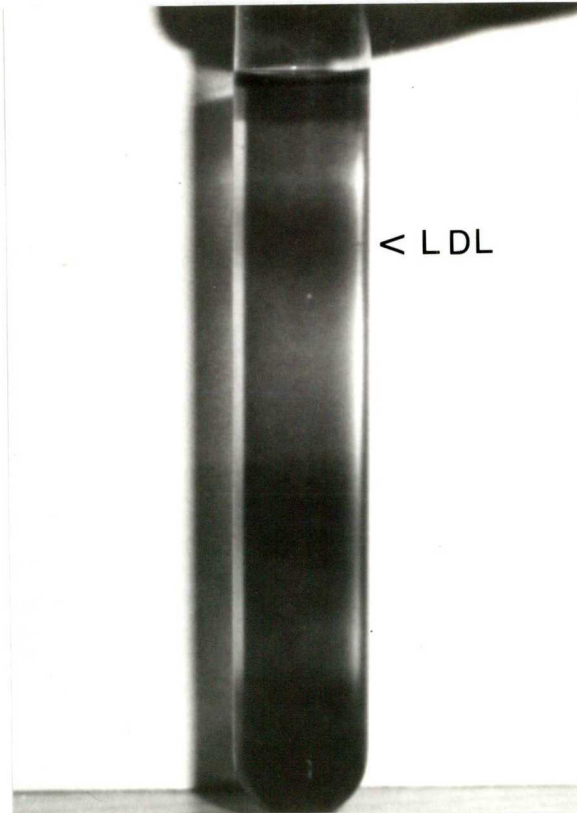


a.

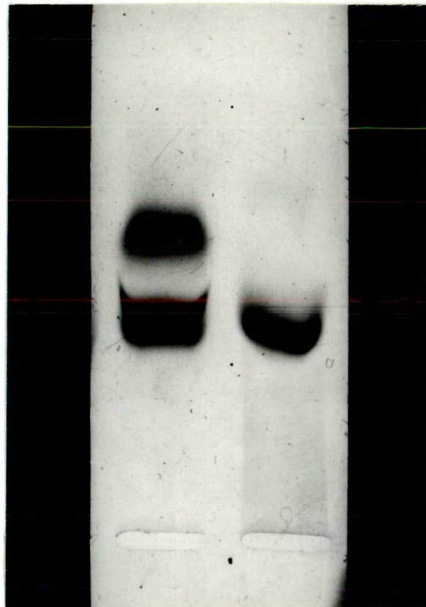


b.

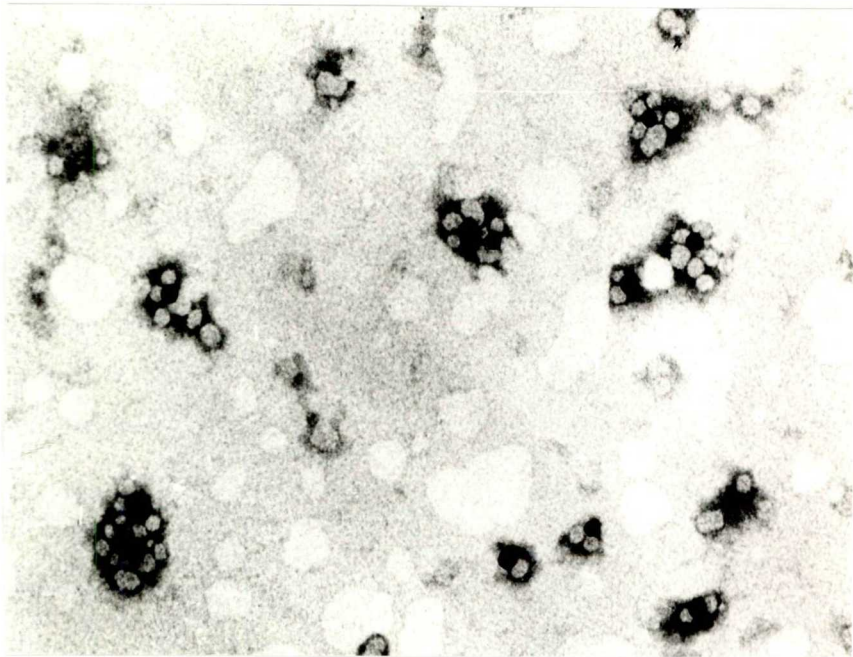
20.kép. Hiperlipémiás nyúl agykérgében található kristályos koleszterin. A kristályok környezetében viszonylag ép mitokondriumok és szinapszisok láthatók. a./ 27500 x, b./ 26600 x.



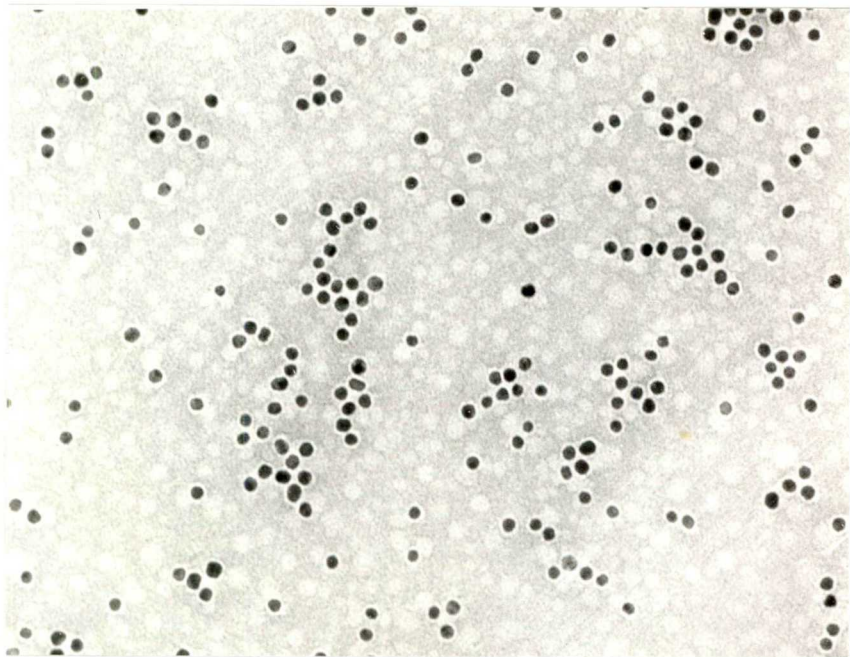
21.kép. Normolipémiás nyúlszérumból sűrűséggrádiens ultracentrifugálással előállított kis sűrűségű lipoprotein /LDL/ frakció.



22.kép. Normolipémiás nyúlszérum és az izolált LDL frakció agaróz gélelektroforézis képe



23.kép. LDL-arany komplex foszforwolframsavval történt negatív festés /PTA 1 %, pH 7,4/ után. 90000 x.



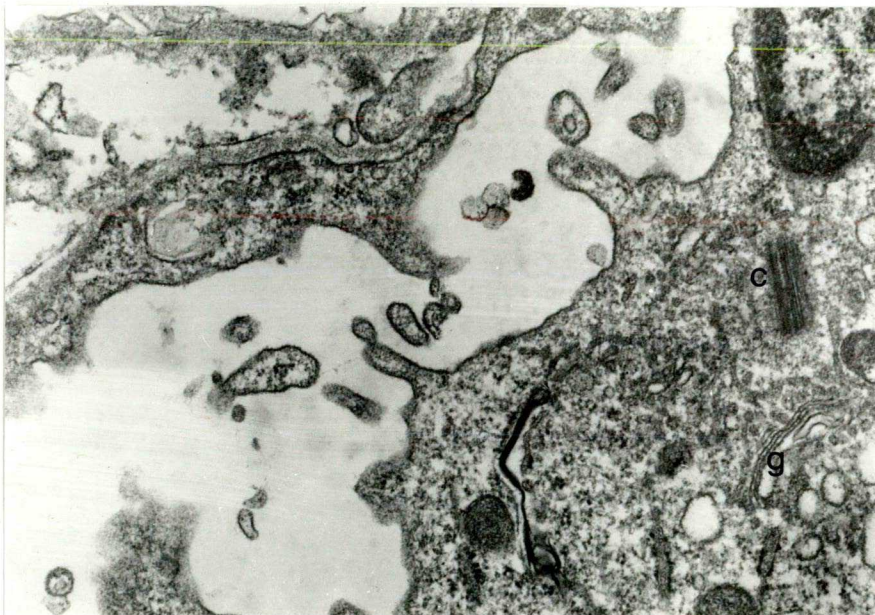
24.kép. Albumin-arany komplex foszforwolframsavval történt negatív festés /PTA 1 %, pH 7,4 %/ után. 85000 x.



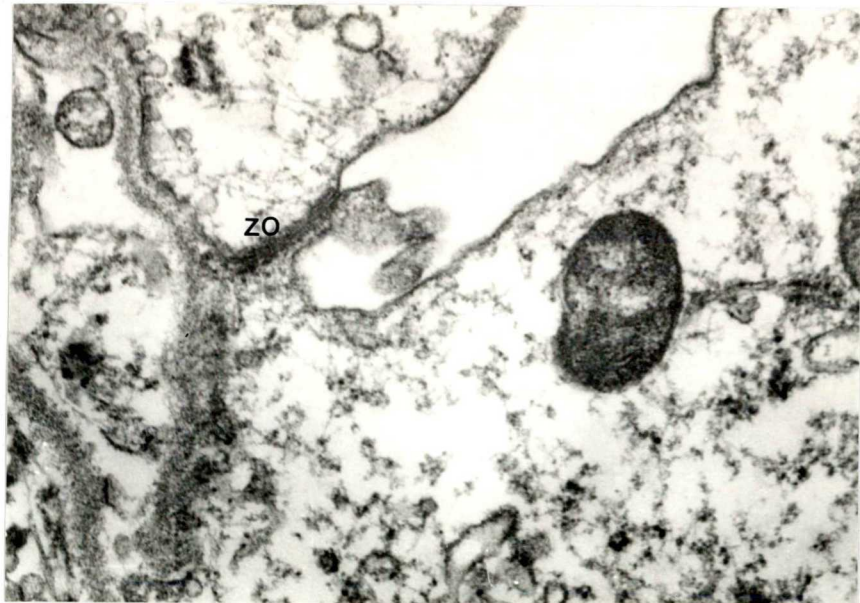
25.kép. Izolált túlélő agykapilláris frakció; tripánkék testés. 320 x.



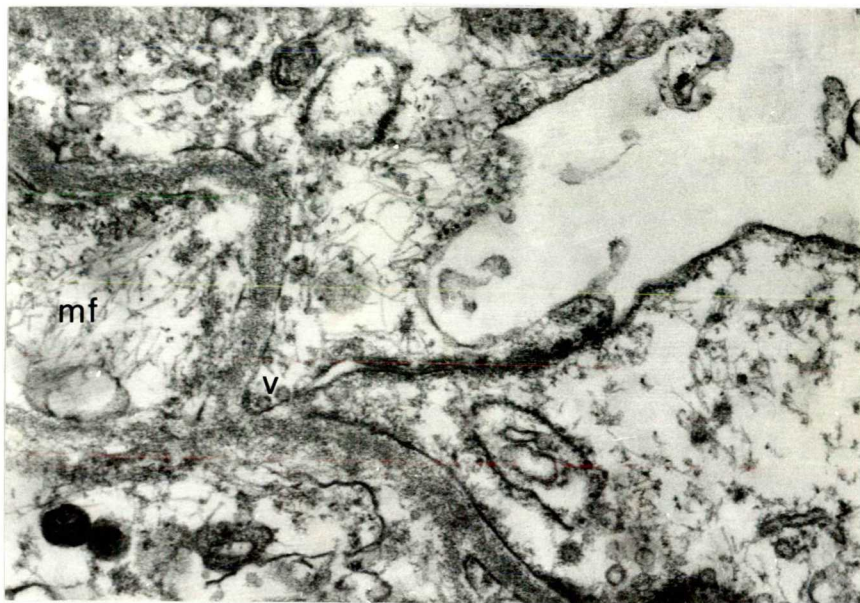
26.a.



26.b.

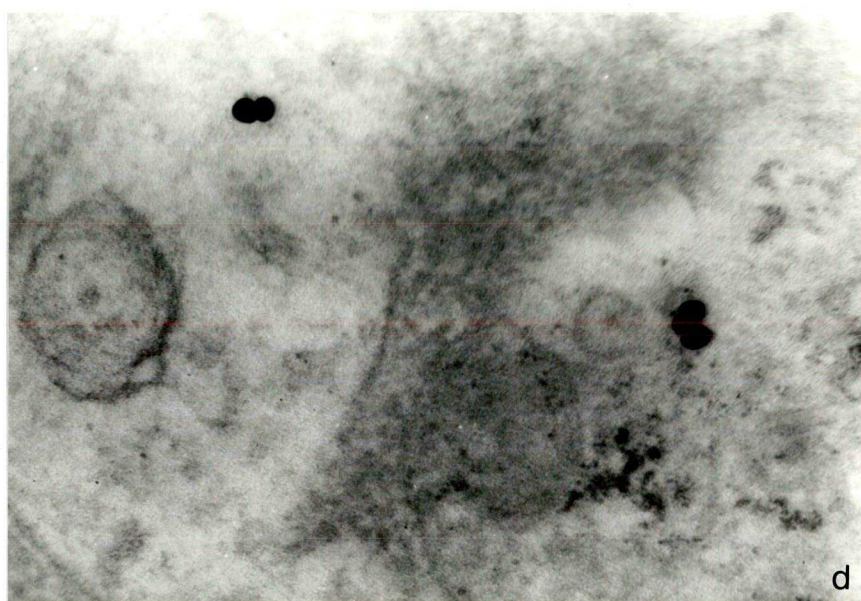
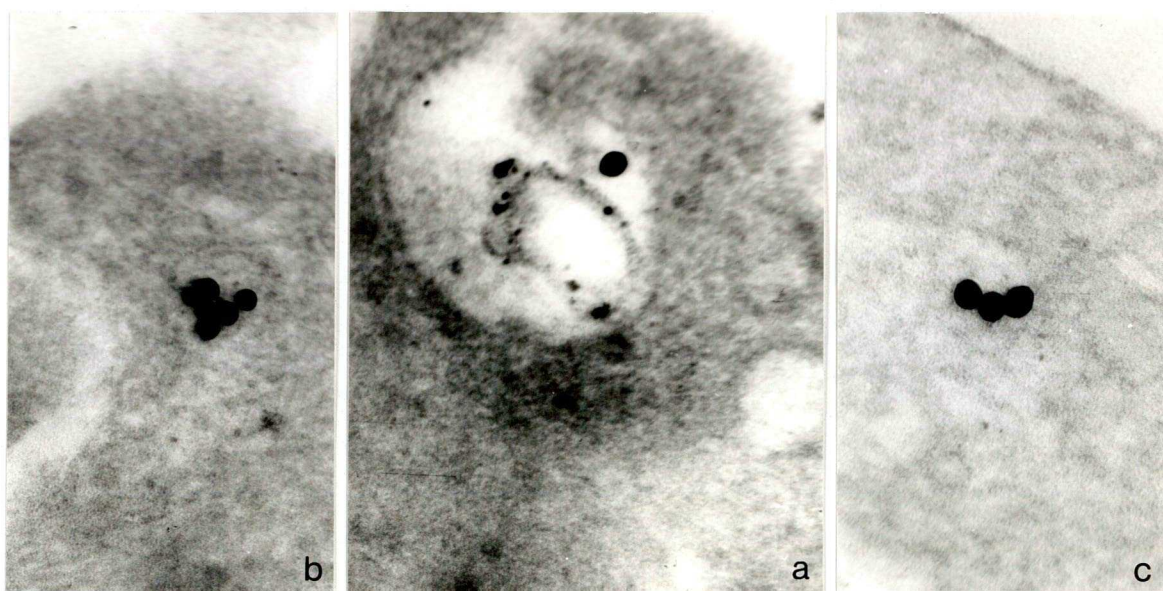


c.



d.

26.kép. Izolált agykérgi kapillárisok elektronmikroszkópos felvételeken; az endotélsejtek struktúrája jól megőrzött, a./ mitokondriumok /m/, sejtmagok /sm/; 26000 x., b./ Golgi apparátus /g/, centriólum /c/; 29700 x; c./ szoros sejtkapcsoló struktúrák /zo/; 40200 x., valamint d./ mikrofilamentumok /mf/ és endocitotikus vezikulák /v/ találhatóak bennük; 39000 x.

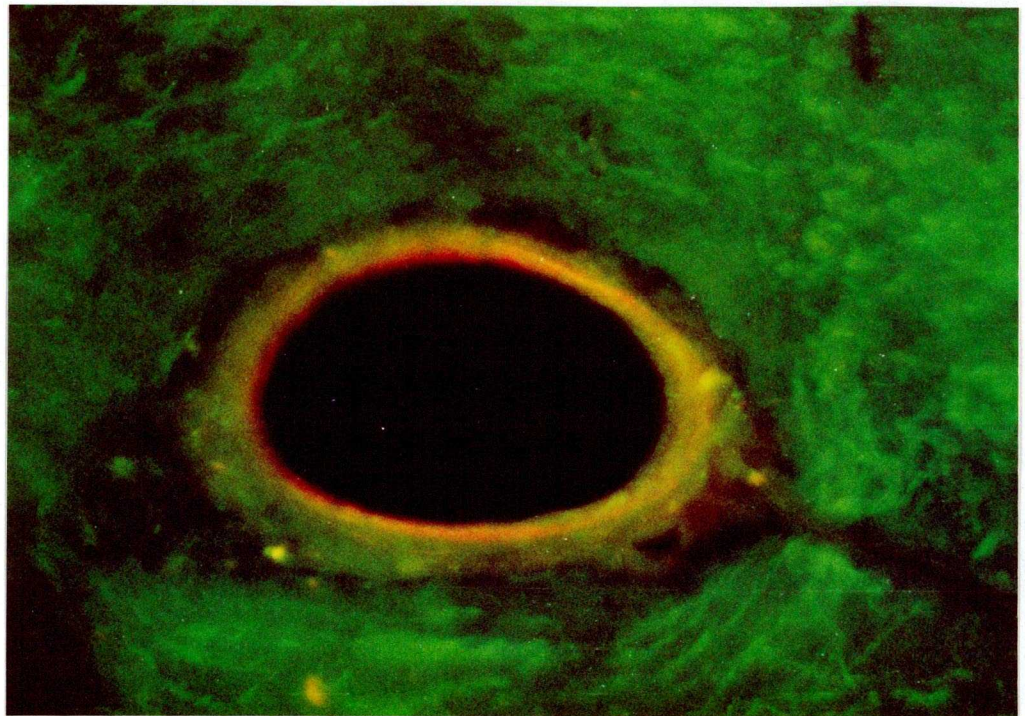


27.kép. Arannyal jelzett LDL felvétele nyúl fibroblaszt sejteken;
a./ 124000 x, b./ 126000 x, c./ 175000 x, d./ 134500 x.

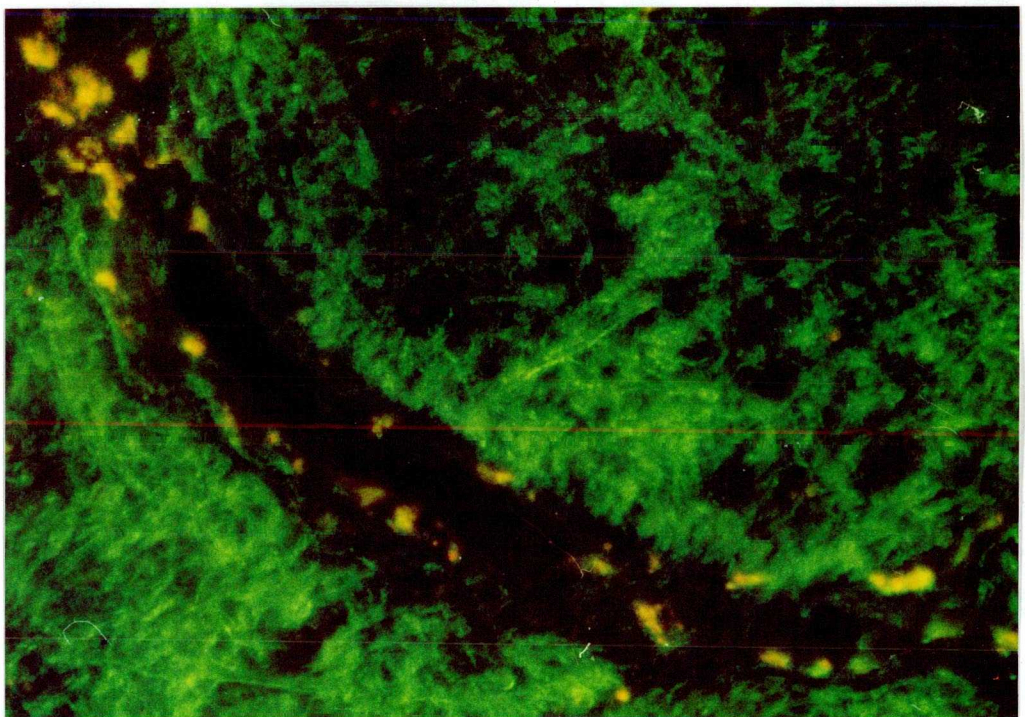


28.kép. Albumin immunhisztokémiai kimutatása normo- /a./ és hiperlipémiás /b./ házinyúl agykérgében. obj. 25 x.



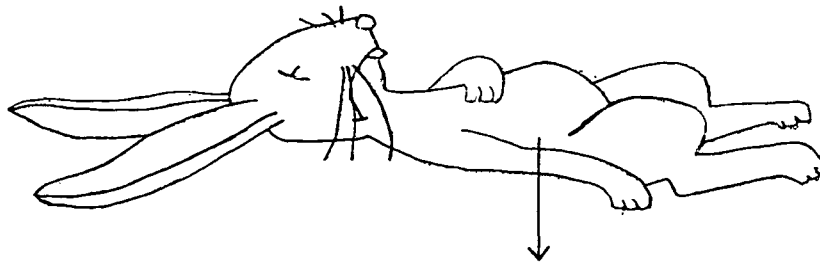


a.



b.

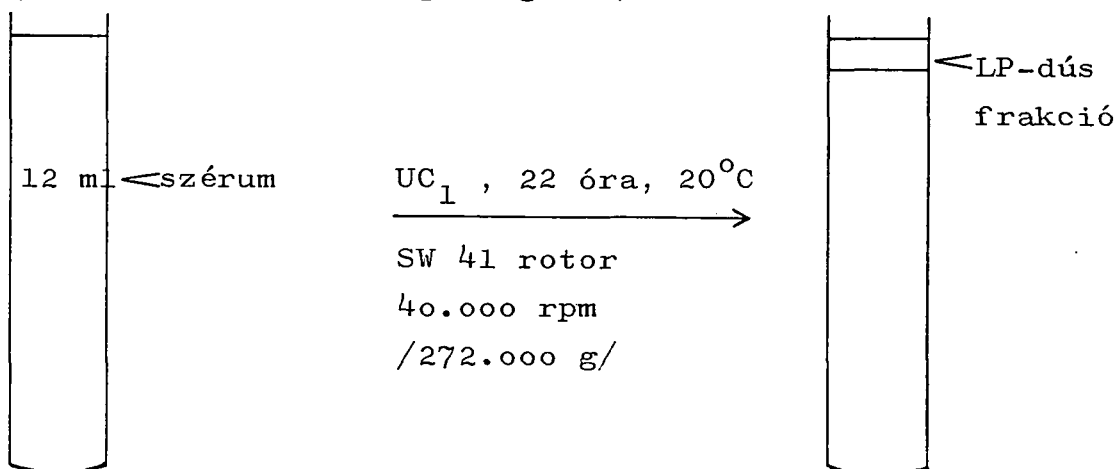
29.kép. a./, b./ Albumin kimutatás Evans kék segítségével /piros fluoreszcencia/ hiperkoleszterinémias nyúl agykérgében /az erek körül lipo-fuszcín szemcsék figyelhetők meg/. obj. 25 x.



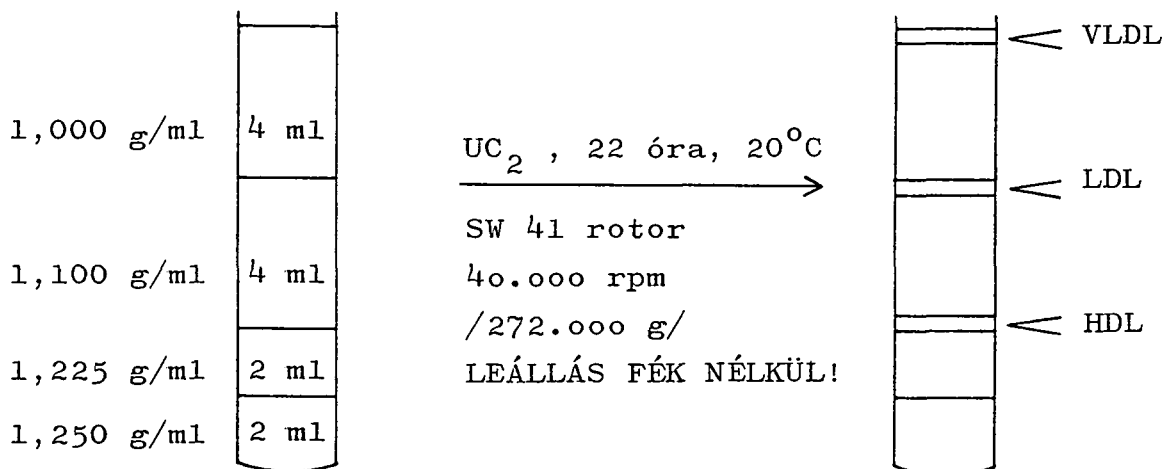
VÉRVÉTEL HASI AORTÁBÓL, KB. 80 ml

CF. ↓ 3000 rpm, Janetzky K 26
30 perc, 10 °C
30 - 40 ml SZÉRUM

SZÉRUM SŰRŰSÉGÉNEK BEÁLLÍTÁSA 1,25 g/ml-re
/KBr és szacharóz segítségével/



LP-dús FRAKCIÓ LESZÍVÁSA — 1 ÉJSZAKA DIALÍZIS, 4°C —
SŰRŰSÉG BEÁLLÍTÁSA 1,25 g/ml-re /KBr és szacharóz segítségével/



LDL RÉTEG LESZÍVÁSA — DIALÍZIS 4°C, 1 ÉJSZAKA —
LIPOPROTEIN FRAKCIÓ HOMOGENITÁSÁNAK ELLENŐRZÉSE AGARÓZ GÉL-
ELFO-n — FEHÉRJE TARTALOM MEGHATÁROZÁSA

1. ábra

Kolloidális aranyoldat készítése, kötése
az LDL-hez és az LDL-arany komplex vizs-
gálata elektronmikroszkóppal

HAuCl_4 0,01%, 50 ml — forralás — 1,6 ml nátrium-
-citrát 1% hozzáadása — további 5' forralás — tiszt-
ta, vörös oldat

1×10^{12} részecske/ml

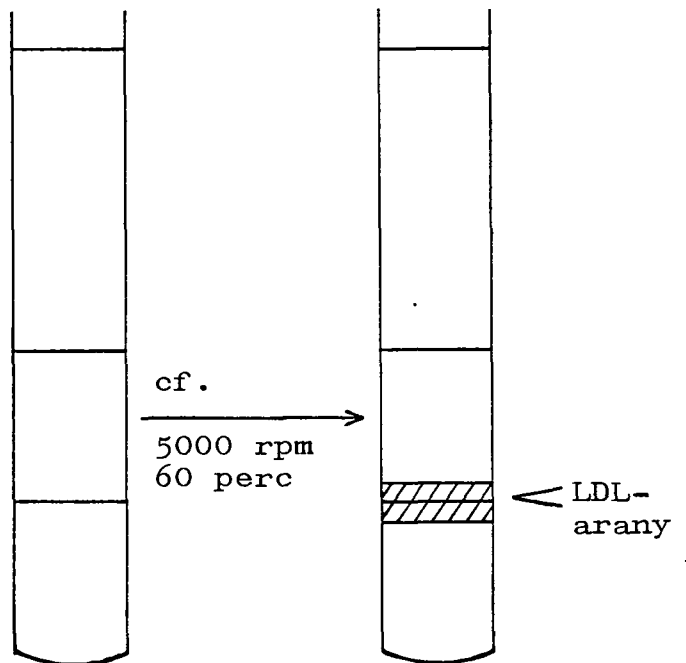
\varnothing 19 nm

LDL kötése a negatív töltésű kolloidális aranyhoz

100 μg LDL/500 μl deszt.
víz + 5 ml kolloidális
arany gyors sugárban, rá-
zás nélkül, szacharóz
grádiensre rétegezve

szacharóz 35%

szacharóz 50%



kívánt réteg leszívása — 1 éjszakás dialízis — a komp-
lex stabilitásának ellenőrzése 0,5 M NaCl-dal — ellenőr-
zés elektronmikroszkóppal

2. ábra

LDL felvétel vizsgálata izolált agykérgi
mikroereken

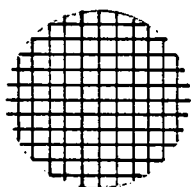
Kísérleti állat:

Új-Zélandi albino nyúl,
hím, 2,5 - 3,0 kg

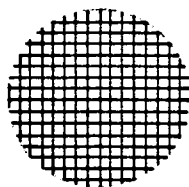
1. Altatás:

Pentobarbital-Na-só
17,5 µg/ml, intravénásan

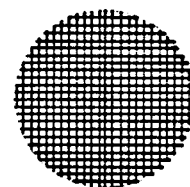
2. Agy eltávolítása, oxigenált RPMI tápoldatba helyezése
3. Agykéreg elválasztása a fehérállománytól
4. Agykéreg felaprítása
5. A szövet átpréselése nylon szűrőkön



330 µ
3x



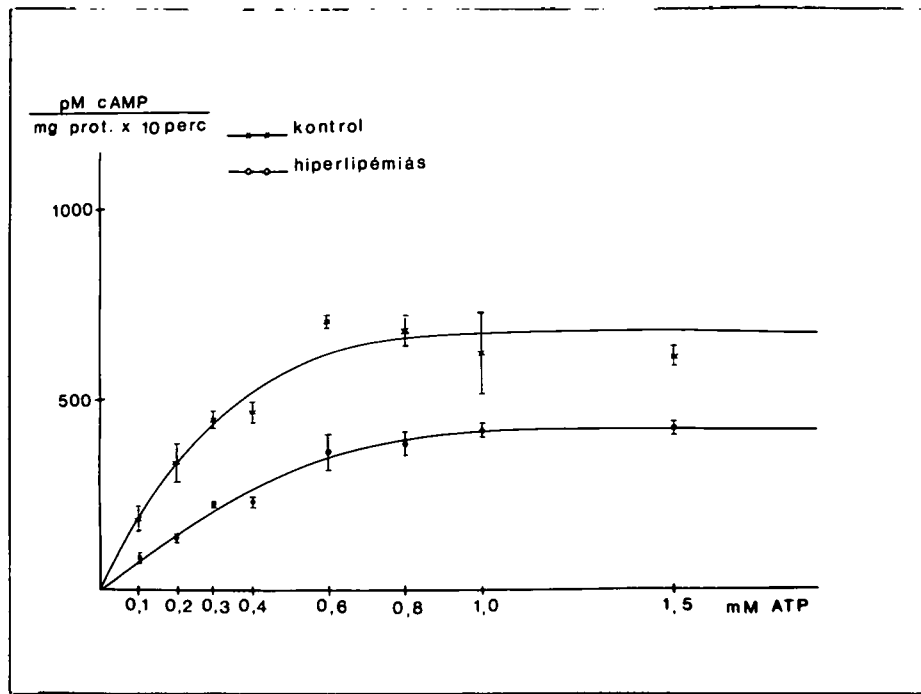
125 µ
3x



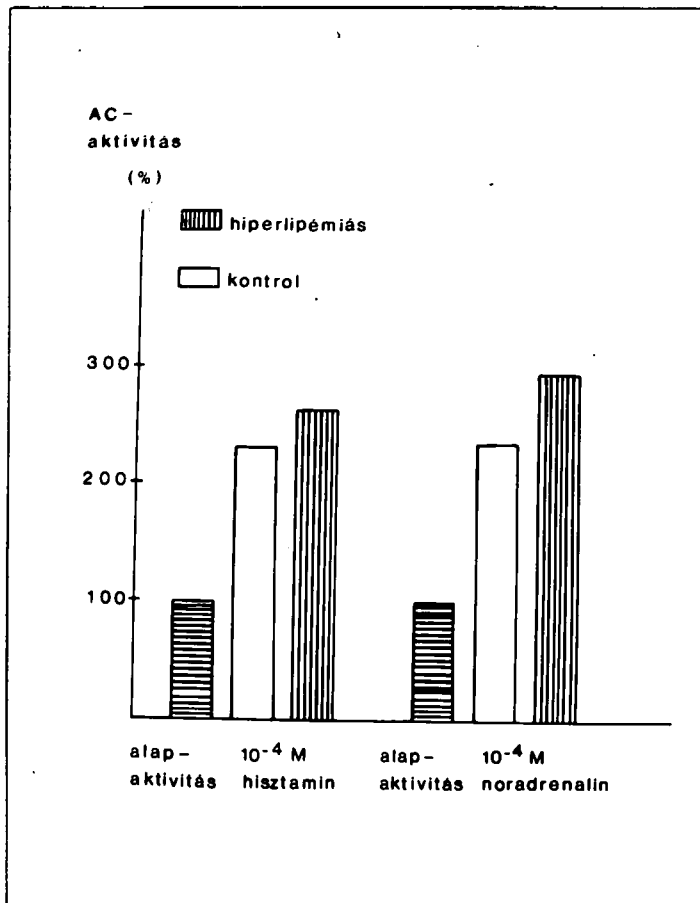
50 µ
mikroerek gyűjtése

túlélő agykapillárisok — inkubáló oldat — 1,2,3 órai
inkubálás 5% CO₂-95% levegő, 37°C — mosás 0,2% BSA-val
kiegészített DPBS-el, majd DPBS-el — fixálás — beágya-
zás EM-re

3. ábra



5. ábra. Normo- és hiperlipémiás házinyúl agykapilláris frakciójában mért adenilcikláz aktivitás



6. ábra. Hisztamin és noradrenalin hatása normo- és hiperlipémiás házinyúl agykapilláris frakciójának adenilcikláz aktivitására

I R O D A L O M

- ADAMS, C.W.M.: Arteriosclerosis in man, other mammals and birds
Biol.Rev. 39 : 372. 1964.
- AIRO, R., Ferrari, C.: High density lipoproteins and apolipoprotein A in cerebrovascular disease
Atherosclerosis 54 : 343-346. 1985.
- ALAM, S.Q., Ren, Y.-F and Alam, B.S.: Effect of cholesterol feeding on membrane fluidity, $(Na^+ + K^+)$ -ATPase, adenylate cyclase, 3H -Ouabain-, and 3H -dihydro-alprenolol-binding in rat submandibular salivary glands
J.Dental Res. 66 (2) : 605-607. 1987
- ALEXANDER, C., Day, C.E.: Distribution of serum lipoproteins of selected vertebrates
Comp.Biochem.Physiol.B. 46 : 295-312. 1973.
- ALTMANN, J., Kornhuber, A.W., Kornhuber, H.H.:
Stroke: cardiovascular risk factors and the quantitative effects of dietary treatment on them
Eur.Neurol. 26 : 90-99. 1987.
- ANDREWS, J.S., Griffitz, W.H., Mead, J.F., Stein, R.A.:
Toxicity of air-oxidized soybean oil
J.Nutr. 70 : 199-210. 1960.
- d'ANGELO, V., Villa, S., Mysliwiec, M., Donati, M.B., de Gaetano G.:
Defective fibrinolytic and prostacyclin-like activity in human atheromatous plaques
Thromb. Haemostasis 39 : 535-536. 1978.
- ANITSCHKOW, N.: Experimental arteriosclerosis in animals
In: Arteriosclerosis, a survey of the problem, ed. by Cowdry, Macmillan, New York, 1933. pp. 271-322.
- ANITSCHKOW, N. and Chalатов, S.: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes
Centralbl. Allgemeine Path. Patholog. Anat. 24 : 1-9. 1913.
- ANITSCHKOW, N.: Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesteratose
Beitr. Path. Anat. 56 : 370. 1913.
- ANTALÓCZY, Z.: Szív- és érbetegségekről mindenkinek
Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1984.
- AQEL, N.M. et al.: Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques
Atherosclerosis 53 (3) : 265-271. 1984.

- ARNTZENIUS, A.C., Kromhont, D. and Kempen, N.: Effect of diet on total cholesterol/HDL-C ratio in patients of Leiden Regression Trial, abstracted
Circulation 68 : 111-226. 1983.
- AVOGARO, P., Bon, G.B., Cazzolato, G.: Presence of a modified low density lipoprotein in humans
Arteriosclerosis 8 (1) : 79-87. 1988.
- BATES, S.R. and Wissler, R.W.: Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells
Biochim. Biophys. Acta 450 : 78. 1976.
- BERSOHN, M.M., Philipson K.D., Fukushima, J.Y.: Sodium-calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischemic rabbit hearts
Am.J.Physiol. 242 : C288-C295. 1982.
- BERTLER, A., Falck, B., Owman, C., Rosengren, E.: The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms
Pharmacol.Rev. 18 : 369-385. 1966.
- BIHARI-VARGA, M., Székely, J., Gruber, É.: Plasma high density lipoproteins in coronary, cerebral and peripheral vascular disease
Atherosclerosis 40 : 337-345. 1981.
- BIRD, R.P., Alexander, J.C.: Effects of vitamin E and ascorbyl palmitate on cultured myocardial cells exposed to oxidized fats
J.Toxicol. Envir. Health 7 : 59-63. 1981.
- BÍRÓ, E.: Biokémia I., II.
Tankönyvkiadó, Budapest, 1985.
- BJORKERUD, S.: Injury and repair in arterial tissue. Experimental models: Types and relevance to human vascular diseases - a survey
Angiology 25 : 636-643. 1974.
- BORDIA, A., Arora, S.K., Kothari, L.K., Jain, K.C., Rathore, B.S., Rathore, A.S., Dube, M.K. and Bhu, N.: The protective action of essential oils of onion and garlic in cholesterol-fed rabbits
Atherosclerosis 22 : 103-109. 1975.
- BOURGAIN, R.H.: The inhibition of PGI₂ synthetase within the arterial wall by 15-hydroperoxyarachidonic acid enhances local white platelet thrombosis
Haemostasis 9 : 345-351. 1980.
- BOXEN, I.: Mechanisms of atherogenesis: endothelial hypoxia as the major initiator
Med.Hypoth. 8 : 297. 1985.
- BREMER, A.M., Yamada, K., West, C.R.: Experimental regional cerebral ischemia in the middle cerebral artery territory in primates
Stroke 9 : 387-391. 1978.

- BRIERLEY, J.B.: Cerebral hypoxia
In: Blackwood, W., Corsellis, J.A.N. (eds)
Greenfield's neuropathology, 3rd edn. Arnold, London, 1976.
- BRIGHTMAN, M.W., Reese, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain
J. Cell Biol. 40 : 648-677. 1969.
- BROWN, M.S., Anderson, R.G.W. and Goldstein, J.L.: Recycling receptors: the round trip itinerary of migrant membrane proteins
Cell 32 : 663-667. 1983.
- BROWN, M.S. and Goldstein, J.L.: Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis
Ann. Rev. Biochem. 52 : 223-261. 1983.
- BROWN, M.S., Kovanen, P.T., Goldstein, J.L.: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors
Science 212 : 628-635. 1981.
- BROWN, M.S. and Goldstein, J.L.: How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis
Sci. Am. 251 (2) : 52-66. 1984.
- BROWN, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, R.P. and Sgherzi, A.M.:
A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate
Biochem. J. 121 : 561-562. 1971.
- CAMEJO, G., Bosch, V., Arreaza, C., and Mendez H.C.: Early changes in plasma lipoprotein structure and biosynthesis in cholesterol-fed rabbits
J. Lipid Res. 14 : 61-68. 1973.
- CERVÓS-NAVARRO, J.: Electronmikroskopische Befund an den Capillaren der Hirnrinde
Arch. Psychiat. Nervenkr. 204 : 484-504. 1963.
- CHAN, C.T. Brecher, P., Haudenschild, C., Chobanian, A.V.: The effect of cholesterol feeding on the metabolism of rabbit cerebral microvessels
Microvasc. Res. 18 /3/ : 353-369. 1979.
- CHAN, P.H. and Fishman, R.A.: Free fatty acids, oxygen free radicals, and membrane alterations in brain ischemia and injury
In: Cerebrovascular diseases, ed. by Plum, F. and Pulsinelli, W., Raven Press, New York, 1985. pp. 161-168.
- CHEN, R.M. and Dzoga, K.: Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells
Atherosclerosis 28 : 339. 1977.



- CHISOLM,G.M., Gainer,J.L., Stoner,G.E., Gainer,V.J.:
Plasma proteins, oxygen transport and atherosclerosis
Atherosclerosis 15 : 327-343. 1972.
- CHISOLM,G.M., Terrado,E.N. and Gainer,J.L.: Physiological transport in re-
lationship to aging
Nature 230 : 390. 1971.
- CLARKSON,T.B., Prichard,R.W., Bullock,B.C.: Pathogenesis of atheroscle-
rosis; Some advances from using animal models
Exp. Mol. Path. 24 : 264-286. 1976.
- CLAWSON,C.C., Hartmann,J.F., Vernier,R.C.: Electron microscopy of the
effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier
J.Comp.Neurol. 127 : 183-197. 1966.
- COMAI,K., Feldman,D.L., Goldstein,A.L. and Hamilton,J.G.: Atherosclero-
sis: An Overview
Drug Development Research 6 : 113-125. 1985.
- CONSTANTINIDES, P.: Production of experimental atherosclerosis in animals
J.Atheroscler.Res. 1 : 374-385. 1961.
- CORTESI,R.A., Privett,O.S.: Toxicity of fatty ozonides and peroxides
Lipids 7 : 715-721. 1972.
- CRONE,C.
In: B.K.Diesjo and S.C.Sorensen (eds.): Ion homeostasis of the brain
Munksgaard, Copenhagen, 1971. pp. 52-62.
- CRONE,C.: The permeability of capillaries in various organs as determined
by use of the indicator diffusion method
Acta Physiol.Scand. 58 : 292-305. 1983.
- DAVID,H.: Elektronenmikroskopische Organpathologie VEB Verlag Volk und
Gesundheit, Berlin, 1967.
- DAWBER,T.R.: "The Framingham Study"
Cambridge, Harvard University Press, 1980.
- DITZEL,J.: Changes in red cell oxygen release capacity in diabetes
mellitus
Fed.Proc. 38 : 2484. 1979.
- DUFF,G.L.: Experimental cholesterol arteriosclerosis and its relationship
to human arteriosclerosis
Arch.Pathol. 20 : 81-123, 259-305. 1935.
- DUFF,G.L. McMillan,G.C. and Kitchie,A.C.: The morphology of early athe-
rosclerotic lesions of the aorta demonstrated by the surface
technique in rabbits fed cholesterol
Am. J. Path. 33 : 845-873. 1957.

- DOUFFIELD, R.G.M., Miller, N.E. and Brunt, J.N.H.: Treatment of hyperlipidaemia retards progression of symptomatic femoral atherosclerosis. A randomized controlled trial. *Lancet* 2 : 639-642. 1983.
- DUX, E., Temesvári, P., Joó, F., Ádám, G., Clementi, F., Dux, L., Hideg, J. and Hossmann, K.-A.: The blood-brain barrier in hypoxia: Ultrastructural aspects and adenylate cyclase activity of brain capillaries *Neuroscience* 12 (3): 951-958. 1984.
- EHRlich, P.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie
A. Hirschwald, Berlin, 1985.
- ENGELBERG, H., Kuhn, R.: Studies of forearm arteriovenous oxygen differences in atherosclerotic patients before and after heparin
Angiology 7 : 73-83. 1956.
- EVENSEN, S.A., Galdal, K.S., Nilsen, E.: LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by anti-oxidant treatment in cultured human endothelial cells and fibroblasts
Atherosclerosis 49 : 23-30. 1983.
- FAGGIOTTO, A., and Ross, R.: Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate
II. Fatty streak conversion to fibrous plaque
Arteriosclerosis 4 : 341-356. 1984.
- FAGGIOTTO, A., Ross, R. and Harker, L.: Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate
I. Changes that lead to fatty streak formation
Arteriosclerosis 4 : 323-340. 1984.
- FELGENHAUER, K.: Protein filtration and secretion at human body fluid barriers
Pfluegers Arch. 384 /1/ : 9-17. 1980.
- FLAMM, E.S., Schiffer, J., Viau, A.T., Naftchi, N.E.: Alterations of cyclic AMP in cerebral ischemia
Stroke 9 : 400-402. 1978.
- FLODIN, N.W.: Atherosclerosis: An insulin-dependent disease ?
J. Am. Coll. Nutr. 5 : 417-427. 1986.
- FRENS, G.: Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solutions
Nat. Phys. Sci. 241 : 20-22. 1973.
- FRIEDEMANN, U.: Blood-brain barrier
Physiol. Rev. 22 : 125-145. 1942.

- GABRIEL, H.G., Alexander, J.C., Valli, V.E.: Effects of intubating rats with fractions from thermally oxidized corn oil and olive oil
Nutr.Rep.Int. 19 : 515-526. 1979.
- GAINER, J.L. and Chisolm, III, G.M.: Altering diffusion rates
Adv.Exp.Med.Biol. 37 : 729. 1973.
- GANFIELD, R.A., Abboud, F.M., Heistad, D.D., Schmid, P.G. and Mark, A.L.:
Vascular oxygen consumption and the myogenic response to increased wall tension
Circulation 44 (SII):78. 1971.
- GEER, J.C. and Daria Haust M.D: Smooth muscle cells in atherosclerosis
In: Monographs on Atherosclerosis Vol.2., Ed.by Pollak, O.J.,
Simms H.S., Kirk, J.E.
S.Karger, Basel, 1972., pp. 1-138.
- GERRITY, R.G.: The role of the monocyte in atherogenesis
I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions
Am.J.Pathol. 103 : 181-190. 1981.
- GERRITY, R.G.: The role of the monocyte in atherogenesis
II. Migration of foam cells form atherosclerotic lesions
Am.J.Pathol. 103 : 191-200. 1981.
- GETZ, G.S., Vesselinovitch, D., Wissler, R.W.: A dynamic pathway of atherosclerosis
Am.J.Med. 46 : 657-673. 1969.
- GEY, K.F.: On the antioxidant hypothesis with regard to arterisclerosis
Sibllthca Nutr. Dieta 37 : 53-91. 1986.
- GLAVIND, J.S., Hartman, J., Clemmensen, K.E., Jessen, K.E., Dam, S.:
Studies on the role of lipoperoxides in human pathology
Arch.Path. Microbiol.Scand. 30 : 1-6. 1952.
- GOLDBERG, W.J., Dorman, R.V., Dabrowiecki, Z. and Horrocks, L.A.:
The effects of ischemia and CDPamines on Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat brain
Neurochem.Pathol. 3 : 237-243. 1985.
- GOLDMANN, E.E.
Abh.Preuss.Acad.Wiss. (Berlin), Phys.Math.Kl.I. 1-60. 1913.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis
Ann.Rev. Biochem. 46 : 897. 1977.
- GOLDSTEIN, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. and Brown, M.S.: Binding site on macrophage that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 333-337. 1979.

- GOLDSTEIN, J.L., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S.: Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis
Nature 279 : 679-685. 1979.
- GOTOH, O., Asano, T., Koide, T., Takakura, K.: Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I.: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood brain barrier permeability to ¹²⁵I-albumin
Stroke 16 : 101-109. 1985.
- GOTO, Y.:
In: Yagi, K.: Lipid peroxides in biology and medicine
Acad. Press, New York, 1982. pp. 295-303.
- GREENBURG, G.B. and Hunt, T.K.: The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages
J. Cell Physiol. 97 : 353-360. 1978.
- GRISHAM, C.M. and Barnett, R.E.: The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium+ potassium) adenosine triphosphatase
Biochemistry 12 : 2635-2637. 1973.
- GRYGLEWSKI, R.J., Dembinska-Kiec, A., Zmuda, A., Gryglewska, T.: Prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis capacities of heart, arteries and platelets at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits
Atherosclerosis 31 : 385-392. 1978.
- GYÁRFÁS, I., Kökény, M.: A szív- és érrendszeri halandóság befolyásolásának lehetőségei
Népegészségügy 64 : 273. 1983.
- HAMILTON, R.M.G. and Carroll, K.K.: Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, low cholesterol diets.
Effects of dietary proteins, carbohydrates and fibre from different sources
Atherosclerosis 24 : 47-62. 1976.
- HANDLEY, D.A., Arbeeny, C.M. Witte, L.D., Chien, S.: Colloidal gold - low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1) : 368-371. 1981.
- HARDEBO, J.E., Owman, C.H.: Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface
Ann. Neurol. 8 : 1-11. 1980.
- HAUST, M.D., More, R.H., Movat, H.Z.: The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis
Am. J. Pathol. 37 : 377-389. 1960.

- HEBDON, G.M., Levine, H.III., Sahyoun, N.E., Schmitges, C.J., Cuatrecasas, P.: Specific phospholipids are required to reconstitute adenylate cyclase solubilized from rat brain
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78 : 120 - 123. 1981.
- HEGSTRAND, L.R., Kanof, P.D., and Greengard, P.: Histamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain
Nature 260 : 163-165. 1976.
- HELIN, P., Lorenzen, I.: Arteriosclerosis in rabbit aorta induced by systemic hypoxia
Angiology 20 : 1-12. 1969.
- HENRIKSEN, T., Mahoney, E.M., Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78 : 6499-6503. 1981.
- HERBERT, P.N. and Terpstra, A.H.M.: Diet and exercise in the treatment of hyperlipoproteinemia
Drug Ther.pp.42-52. 1984. (május)
- HEUGHAN, C., Ninikowski, J., Hunt, T.K.: Oxygen tensions in lesions of experimental atherosclerosis of rabbits
Atherosclerosis 17 : 361-367. 1973.
- HINSBERGH, V.W.M. van: LDL cytotoxicity
Atherosclerosis 53 : 113-118. 1984.
- HOLLAND, R.A.B., Shibata, H., Scheid, P. and Piiper, J.: Kinetics of O₂ uptake and release by red cells in stopped-flow apparatus: effects of unstirred layers
Resp.Physiol. 59 : 71. 1985.
- HOSSMANN, K.-A. Schuier, F.J.: Metabolic (cytotoxic) type of brain edema following middle cerebral artery occlusion in cats
In: Price, T.R., Nelson, E. (eds.) Cerebrovascular diseases, Raven Press, New York, 1979. pp.: 141-165. (a)
- HOSSMANN, K.A., Schuier, F.J.: Pathophysiology of stroke edema
In: Zülch, K.J. et al. (eds.). Brain and heart infarct II., Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1979. pp. 119-129. (b)
- HOSSMANN, K.A.: Development and resolution of ischemic brain swelling
In: Pappius, H.M., Feindel, W. (eds.): Dynamics of brain edema. New York, Springer-Verlag, 1976. pp. 219-227.
- HUEPER, W.C.: Arteriosclerosis. The Anoxemia Theory
Arch.Pathol. 39 : 162; 245; 350. 1944.

- HUFF, M.W., Hamilton, R.M.G., and Carroll, K.K.: Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat cholesterol-free, semi-purified diets: effect of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures
Atherosclerosis 28 : 187 - 195. 1977.
- HUXLEY, V.H. and Kutchai, H.: The effect of the red cell membrane and a diffusion boundary layer on the rate of oxygen uptake by human erythrocytes
J. Physiol. (London) 316 : 75. 1981.
- HWANG, S.M., Weis, S., and Segal, S.: Uptake of L-³⁵S/ Cystine by isolated rat brain capillaries
J. Neurochem. 35 (2) : 417-424. 1980.
- INMAN, W.W., Wesley, M.P.: Investigations on deaths from pulmonary, coronary and cerebral thrombosis and embolism in women of childbearing age
Brit. Med. J. 2 : 193. 1968.
- IWAKAMI, M.: Peroxides as a factor of atherosclerosis
Nagoya J. Med. Sci. 28 : 50-66. 1965.
- JAJICH, C.L., Ostfeld, A.M., Freeman, D.H.: Smoking and coronary heart disease mortality in the elderly
JAMA 252 (20) : 2831. 1984.
- JÁNOSI, A. és Arnold Cs. (szerk.): Szív- és érrendszer betegségek
Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1983.
- JOHANSSON, M.B., Karlsson B.W.: Lipoproteins in serum of rat, mouse, gerbil, rabbit, pig and man studied by electrophoretical and immunological methods
Comp. Biochem. Physiol. 54B : 495-500. 1976.
- JOO, F. and Karnushina, I.: A procedure for the isolation of capillaries from rat brain
Cytobios 8 : 41-48. 1973.
- JORIS, I., Krolikowski, F.J., Majno, G. et al.: Pathogenesis of atherosclerosis. A study in the rat
Fed. Proc. 42 : 772. 1983.
- JORIS, I., Zand, T., Nunnari, J.J., Krolikowski, F.J., Majno G.: Studies on the pathogenesis of atherosclerosis:
I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats
Am. J. Pathol. 113 : 341-358. 1983.
- JORIS, I., Billingham, M.E., Majno, G.: Human coronary arteries: an ultrastructural search for the early changes of atherosclerosis
Fed. Proc. 43 : 710. 1984.

- JÜRGENS, G. and Költringer, P.: Lipoprotein(a) in ischemic cerebrovascular disease: A new approach to the assessment of risk for stroke
Neurology 37: 513-515. 1987.
- KALARIA, R.N. and Harik, S.I.: Blood-brain barrier monoamine oxidase: Enzyme characterization in cerebral microvessels and other tissues from six mammalian species, including human
J. Neurochem. 49 : 856-864. 1987.
- KALCKAR, H.M., Kinoshita, J.H., Donnell, G.N.:
In: Gaull, G.E. (ed.): *Biology of brain dysfunction, Vol. I.*
New York, Plenum Press, 1973. pp. 31-88.
- KANNEL, W.B., Wolf, P.A., Dawber, T.R.: Hypertension and cardiac impairments increase stroke risk
Geriatrics 33 : 71. 1978.
- KIRK, J.E. and Laursen, T.J.S.: Diffusion coefficients of various solutes for human aortic tissue, with special reference to variation in tissue permeability with age
J. Geront. 10 : 288. 1955.
- KJELDSEN, K., Wanstrup, J. and Astrup, P.: Enhancing influence of arterial hypoxia on the development of atheromatosis in cholesterol-fed rabbits
J. Atheroscler. Res. 2 : 835. 1968.
- KJELDSEN, K., Astrup, P., Wanstrup, J.: Resersal of rabbit atheromatosis by hyperoxia
J. Atheroscl. Res. 10 : 173-178. 1969.
- KLATZO, I.: Neuropathological aspects of brain edema
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 26 : 1-14. 1967.
- KOVACHICH, G.B., Mishra, O.P.: Partial inactivation of Na,K-ATPase in cortical brain slices incubated in normal Krebs-Ringer phosphate medium at 1 and 10 atm oxygen pressures
J. Neurochem. 36 : 333-335. 1981.
- KOVÁCH, A.: A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei, I. kötet
Akadémia Kiadó, Budapest, 1954.
- KRITCHEVSKY D., Moyer, A.W., Tesar, W.C., Logan, J.B. Brown, R.A., Davies, M.D. and Cox, H.R.: Effect of cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis
Am. J. Physiol. 178 : 30-32. 1954.
- KUO, P.T., Joyner, C.R.: Effect of heparin on lipemia-induced angina pectoris
J. Am. Med. Ass. 163 : 68-75. 1957.
- KUO, P.T., Whereat, A.E.: Lipemia as a cause of arterial oxygen unsaturation and the effect of its control in patients with atherosclerosis
Circulation 16 : 493. 1957.

- KUTAS,M., Bodosi,M.: Orale Antikonzeptionsmittel und Schädigungen des Zentralnervensystems
Münch.Med.Wschr. 113 : 42. 1971.
- LAJTHA,A., Mela,P., Waelsch,H.: Manganese-dependent glutamotransferase
J.Biol.Chem. 205 : 553-564. 1953.
- LEE,D.M. and Downs,D: A quick and large-scale density gradient subfractionation method for low density lipoproteins
J.Lipid Res. 23 (1): 14-27. 1982.
- LEE,J.C.: Evaluation in the concept of the blood-brain barrier phenomenon
In: Progress in Neuropathology, Vol. 1.
Zimmermann,H.M.(ed.), Grune and Stratton, New York, 1971. pp. 84-145.
- LEE,J.C., Haymaker,W. and Adams,R.D.(eds.): Histology and histopathology of the nervous system
C.S.Thomas, Springfield, 1982. pp. 798-870.
- LEONI,S., Luly,P., Magiantini,M.T. and Spagnuolo,S.:
Effect of free fatty acids and cholesterol in vitro on liver plasma membrane-bound enzymes
Experientia 38 : 102-104. 1982.
- LEVY,R.: The decrease in coronary heart disease mortality - Status and spectives on the role of cholesterol
The Am.J.Cardiol. 54 (5): 35C. 1984.
- LEWIS,J.C., Taylor,R.G., Jones,M.D., St.Clair,R.W., Cornhill,J.F.:
Surface characteristics in pigeon coronary artery atherosclerosis
Lab. Invest. 46 : 123-138. 1982.
- LINSENMEIER, R.A., and Steinberg, R.H.: Effects of hypoxia on potassium homeostasis and pigment epithelial cells in the cat retina
J.Gen.Physiol. 84 : 945-970. 1984.
- LIONETTI,F.J., Hunt,S.M., Lin,P.S., Kurtz,S.R., Valeri,C.R.:
Preservation of human granulocytes. II.Characteristics of granulocytes obtained by counterflow centrifugation
Transfusion 17 : 465-472. 1977.
- LITTLE,J.R., Kerr,F.W.L., Sundt,T.M.: Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia: An electron microscopic investigation in monkeys
Stroke 7 : 25-30. 1976.
- LO,W.D., Betz,A.L., Schielke,G.P., Hoff,J.T.: Transport of sodium from blood to brain in ischemic brain edema
Stroke 18 : 150 - 157. 1987.
- LOWRY,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent
J.Biol. Chem. 193 : 265-275. 1951.

- LRCP, Lipid Research Clinics Program: The lipid research clinics coronary primary prevention trial results.
1. Reduction in incidence of coronary heart disease
JAMA 251 : 351-364. 1984.
- MAJNO,G.: Ultrastructure of the vascular membrane.
In: Handbook of physiology. Sect. 2. Circulation,
Vol.III.
Hamilton,W.F. (ed.), American Physiological Society,
Washington,D.C., 1965. pp. 2293-2375.
- MAJNO,G., Joris,I. and Zand,T.: Atherosclerosis: New Horizons
Human Pathology 16 (1):3. 1985.
- MAKÁRY,A., Pataki,M., Tóth,E., Lusztig,G.: The effect of hypoxia and hypokinesia on prostacyclin /PGI₂/ production of vessel wall
Exp. Pathol. 32 : 251-253. 1987.
- MAKÁRY,A., Pataki,M., Stadler,I., Virág,S.,Lusztig,G.:
Effect of prostacyclin and its derivative /5-NO₂-PGI₁/
in experimental atherosclerosis on rabbits
European Artery Club, 4th Annual Conference, Budapest,
Jan 16-19, 1983.
- MAKÁRY,A., Pataki,M., Lusztig,G., Stadler I., Virág,S.:
Effect of prostacyclin /PGI₂/ on atherosclerosis in rabbits
V. International Conference² on Prostaglandins
Florence, May 18-21, 1982.
- MARTIN,G.I., Hueper,W.C.: Biochemical studies of atheromatous animals
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 48 : 452-455. 1942.
- MASUDA,Y., Ochi,Y., Karasawa,T., Hatano,N., Kadokawa,T., Okegawa,T.:
Protective effect of a new prostacyclin analogue
OP-2507 against cerebral anoxia and edema in experimental animals
Eur.J. Pharmacol. 123 (3): 335-344. 1986.
- McCULLY,K.S. and Wilson,R.B.: Homocysteine theory of arteriosclerosis
Atherosclerosis 22 : 215-227. 1975.
- McGEE,D.: The probability of developing cardiovascular disease in eight years at specified values of some characteristics
In: Kannel,W.B., Gordon,I. (eds.): The Framingham Study, An epidemiological investigation of cardiovascular diseases. Section 28. US Government Printing Office, Washington DC., 1973.
- MERODE,T.V., Hick.P. Hoeks,A.P.G., Reneman,R.S.:
Serum HDL/total cholesterol ratio and blood pressure in asymptomatic atherosclerotic lesions of the cervical carotid arteries in men
Stroke 16 (1): 34-38. 1985.

- MILHORAT, T.H., Davis, D.A., Lloyd, B.J.: Two morphologically distinct blood brain barriers preventing entry of cytochrome C into cerebrospinal fluid
Science 180 : 76-78. 1973.
- MILLS, G.L., Tylaur, C.E.: The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals
Comp. Biochem. Physiol. B. 40 : 489-501. 1971.
- MITCHINSON, M.J., Hothersall, D.C., Brooks, P.N., de Burre, C.Y.: The distribution of ceroid in human atherosclerosis
J. Path. 145 : 177-183. 1985.
- MONCADA, S., Vane, J.R.: Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis
Br. Med. Bull. 34 : 129-135. 1978.
- MOREL, D.W., Hessler, J.R., Chisolm, G.M.: Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids
J. Lipid Res. 24 : 1070-1076. 1983.
- MORISAKI, N., Shinomiya, M., Mizobuchi, M., Fujiyama, Y., Sasaki, N., Shirai, K., Matsuoka, N., Saito, Y. and Kumagai, A.: Lipid metabolism in the aorta and the brain microvessels of rabbits on high cholesterol diet
Artery 11 (3) : 225. 1982.
- MURAI, A., Tanaka, T., Miyahara, T., Kameyama, M.: Lipoprotein abnormalities in the pathogenesis of cerebral infarction and TIA
Stroke 12 : 167-172. 1981.
- NAG, S.: Cerebral changes in chronic hypertension: Combined permeability and immunohistochemical studies
Acta Neuropathol. 62 (3): 178-184. 1984.
- NATHAN, C.F., Murray, H.W. and Cohn, Z.A.: Current concepts: the macrophage as an effector cell
N. England J. Med. 303 : 622-626. 1980.
- NAVARI, R.M., Gainer, J.L. and Hall, K.R.: A predictive theory for diffusion in polymer and protein solutions
AIChE Journal 17 : 1028 1971.
- NGUYEN, D.: Role of pressure in atherogenesis
Medical Hypothesis 16 : 239-240. 1985.
- NHLBI Type II Coronary Intervention Study Committee: Influence of cholestyramine-induced lipid changes on coronary artery disease progress, abstracted
Circulation 68 : 111-188. 1983.

- NIKKILA, E.A., Viikinkosko, P. and Valle, M.: Effect of lipid lowering treatment on progression of coronary atherosclerosis. A 7-year prospective angiographic study, abstracted
Circulation 68 : 111-226. 1983.
- NINIKOWSKI, J., Heughan, C., Hunt, T.K.: Oxygen tension in the arterial wall of normal rabbits
Atherosclerosis 17 : 353-359. 1973.
- NITSCH, C. Fujiwara, K., Kuroiwa, T. and Klatzo, I.: Specific gravity increases and brain water content decreases during short epileptiform seizures in discrete rabbit brain areas
J. Neurol. Sci. 64 : 119-129. 1984.
- NOMA, A., Matsushita, S., Komori, T., Abe, K., Okabe, H., Kuramoto, K., Murakami, M.: High and low density lipoprotein cholesterol in myocardial and cerebral infarction
Atherosclerosis 32 : 327-331. 1979.
- O'BRIEN, M.D., Waltz, A.G., Jordan, M.M.: Ischemic cerebral edema. Distribution of water in brains of cats after occlusion of the middle cerebral artery
Archives of Neurology 30 : 456-460. 1974.
- OKAMOTO, R., Hatani, M., Tsukitani, M., Suehiro, A., Fujino, M., Imai, N., Takano, S., Watanabe, Y. and Fukuzaki, H.:
The effect of oxygen on the development of atherosclerosis in WHHL rabbits
Atherosclerosis 47 : 47. 1983.
- OLÁH, A., Kállai, K., Vadnai, Zs.: Reformkönyha
Mezőgazdasági Kiadó, Bp., 1985.
- OLDENDORF, W.H., Brown, W.J.: Greater number of capillary endothelial mitochondria in brain than in muscle
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149 : 736-738. 1975.
- OLDENDORF, W.H., Cornford, M.E. and Brown, W.J.: Some unique ultrastructural characteristic of rat brain capillaries
In: *Cerebral Microcirculation and Metabolism*
Cervós-Navarro, J. and Fritschka, E. (eds.), Raven Press, New York, 1981. pp.9-15.
- PATAKI, M., Makáry, A., Virág, S., Lusztig, G.: Antiatherogenic effect of prostacyclin /PGI₂/ and the alteration of PGI₂-and TXA₂-production of the aorta in cholesterol-fed rabbits
7th Hungarian Arteriosclerosis Conference.
Acta Morph. Hung. 32 : 38. 1984. Abstr.
- PAYTON, C.D., Belch, J.J.F., Boulton, J.J.M.: Successful treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura by Epoprostenol infusion
The Lancet Vol. I., No. 8434.: 927-928. 1985.

- PEARSON, J.D.: Lipid metabolism in cultured smooth muscle cells and comparison with other types, Part 1.
(Composition of cells grown in hyperlipemic serum)
Atherosclerosis 24 : 233. 1976.
- PESCADOR, R.: Rabbit strain differences in plasma lipoprotein pattern and in responsiveness to hypercholesterolemia
Life Sciences 23 : 1851-1862. 1978.
- PLUTA, R.: Influence of Prostacyclin on early morphological changes in the rabbit brain after complete 20-min ischemia
J. Neurol.Sci. 70 : 305-316. 1985.
- POLEDNE, R., Reinis, Z., Lojda, Z., Hanus, R., Cihová, Z.:
The inflow rate of low density lipoproteins cholesterol to the arterial wall in experimental atherosclerosis
Physiol. Bohemoslovaca 35 : 313-318. 1986.
- POLLIN, W., Ravenholt, R.T.: Tobacco addiction and tobacco mortality
JAMA 252 (20) : 2849. 1984.
- RABKIN, S.W., Mathewson, I.A.L., Tate, R.B.: The relation of blood pressure to stroke prognosis
Annals of Internal Medicine 89 : 15. 1978.
- RAILTON, R., Newman, P., Hislop, J. and Harrower, A.D.B.:
Reduced transcutaneous oxygen tension and impaired vascular response in type 1 (insulin dependent) diabetes
Diabetologia 25 : 340. 1983.
- RAPOPORT, S.I.: *Blood-brain barrier in physiology and medicine*, Raven Press, New York, 1976. pp. 229-232.
- RAPPAPORT, F., Eishhorn, F.: Sufosalicylic acid as a substitute for paratoluene sulfonic acid
A. In the estimation of cholesterol
B. In the diagnostic test for systemic lupus erythematosus
Clin.Chim.Acta 5 : 161-3. 1960.
- RATHBURN, W.B. and Betlac, M.V.: Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine-triphosphate
Anal. Biochem. 28 : 436-445. 1969.
- REESE, T.S., Karnovsky, M.J.: the structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase
J.Cell Biol. 34 : 207-217. 1967.
- REESE, T.S., Feder, N., Brightman, M.W.: Electron microscopic study of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers with microperoxidase
J.Neuropathol. 30 : 137-138. 1971.

- ROBENEK, H., Rassat, J., Hesz, A. and Grünwald, J.: A correlative study on the topographical distribution of the receptors for low density lipoprotein /LDL/ conjugated to colloidal gold in cultured human skin fibroblasts employing thin section, freeze-fracture, deep-etching, and surface replication techniques
Eur. J. Cell Biol. 27 : 242-250. 1982.
- RONCALI, L., Ribatti, D., Nico, B. and Bertossi, M.: Blood vessel ultrastructure in the chick optic tectum developing under chronic hypoxia conditions
Acta Neuropathol. (Berl.) 67 : 242-246. 1985.
- ROSENBLUM, I.Y., Flora, L., and Eisenstein, R.: The effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1 diphosphonate (EHDP) on a rabbit model of athero-arteriosclerosis
Atherosclerosis 22 : 411-424. 1975.
- ROSS, A.C., Minick, C.R., and Zilversmit, D.B.: Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low fat diet or cholesterol - supplemented diet
Atherosclerosis 29 : 301-315. 1978.
- ROSS, R., Glomset J., Kariya, B. and Harker L.: A platelet - dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 1207-1210. 1974.
- ROSS, R., Harker, L.: Hyperlipidemia and atherosclerosis: Chronic hyperlipidemia initiates and maintains lesions by endothelial cell desquamation and lipid accumulation
Science 193 : 1094-1098. 1976.
- ROSS, R.: George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis - a problem of the biology of arterial wall cells and their interaction with blood components
Arteriosclerosis 1 : 293-311. 1981.
- ROSS, R., Bowen-Pope, D., Raines, E.W. et.al.: Endothelial injury: blood-vessel wall interactions
In: *Endothelium*, Ann. NY. Acad. Sci. 401 : 260. 1982.
- ROSS Russel, R.W.: *Vascular disease of the central nervous system*
Edinburgh, 1983.
- RUBANYI, G.M., and Vanhoutte, P.M.: Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium
J. Physiol. (London) 364 : 45. 1985.
- SCARPACE, P.J., O'Conner, S.W. and Abrass, I.B.: Cholesterol modulation of B-adrenergic receptor characteristics
BBA 845 : 520 - 525. 1985.

- SCHNEIDER, R., Ringelstein, E.B., Zeumer, H., Kieseewetter, H., and Jung, F.:
The role of plasma hyperviscosity in subcortical arteriosclerotic
encephalopathy (Binswanger's disease)
J. Neurol. 234 : 67-73. 1987.
- SCHUIER, F.J., Hossmann, K.-A.: Experimental brain infarcts in cats.2.
Ischemic brain edema
Stroke 11 : 593-601. 1980.
- SCHUIER, F.J., Vise, M., Hossmann, K.-A., Zülch, K.J.: Cerebral microemboliza-
tion. II. Morphological studies
Archives of Neurology 35 : 264-270. 1978.
- SCHUMAKER, V.N.: Cholesterolemic rabbit lipoproteins:
serum lipoproteins of the cholesterolemic rabbit
Am. J. Physiol. 134 : 35-42. 1956.
- SCHWARTZ, S.M. and Ross, R.: Cellular proliferation in atherosclerosis and
hypertension
Progress in Cardiovascular Diseases
26 (5): 355-372. 1984.
- SHURTLEFF, D.: Some characteristics related to the incidence of
cardiovascular disease and death: Framingham Study, 18-year follow-up
In: Kannel, W.B., Gordon, T. (eds.): The Framingham Study.
An epidemiological investigation of cardiovascular diseases. Section
30. US Government Printing Office, Washington DC, DHEW Publication,
No. (NIH) 74-599. 1973.
- SCHWARTZ, S.M. and Ross, R.: Cellular proliferation in atherosclerosis and
hypertension
Progress in Cardiovascular Diseases
26 (5): 355-372. 1984.
- SIMIONESCU, N.: Transcytosis and traffic of membranes in the endothelial cell
In: International Cell Biology 1980-1981. H.G. Schweiger, ed,
Springer-Verlag, Berlin., 1981. pp. 657-672.
- SIMPKINS, H., Hokin, L.E.: Studies on the characterization of the sodium-
potassium transport adenosine-triphosphatase.
XIII. On the organization and role of phospholipids in the purified
enzyme
Arch. Biochem. Biophys. 159 : 897-902. 1973.
- SIRTORI, C.R., Gianfranceschi, G., Gritti, I., Mappi, G., Brambilla, G.,
Paoletti, P.: Decreased high density lipoprotein cholesterol levels in
male patients with TIA
Atherosclerosis 32 : 205-211. 1979.
- SMITH, E.S.: Biochemical studies on permeability and the interaction between
blood constituents and arterial components in atherosclerosis
In: Gotto, A.M. (ed.): Atherosclerosis V., Springer-Verlag, 1980.
pp. 121-125.

- SPATZ, H.: Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und der übrigen Körper. Das morphologische Substrate der Stoffwechselschranken im Zentralorgan
Arch. Psychiat. Nervenkr. 101 : 267-358. 1933.
- STAHL, W.L.: Role of phospholipids in the Na^+, K^+ -stimulated adenosine triphosphatase system of brain microsomes
Arch. Biochem. Biophys. 154 : 56-67. 1973.
- St. CLAIR, R.W. and Leight, M.A.: Differential effects of isolated lipoproteins from normal and hypercholesterolemic rhesus monkeys on cholesterol esterification and accumulation in arterial smooth muscle cells in culture
Biochim. Biophys. Acta 530 : 279. 1978.
- STEINBRECHER, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., Steinberg, D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81 : 3883-3887. 1984.
- SUN, A.Y. Samorajski, T.: Effects of ethanol on the activity of adenosine-triphosphatase and acetylcholin-esterase in synaptosomes isolated from guinea-pig brain
J. Neurochem. 17 : 1365-1372. 1970.
- SZCZEKLIK, A., Gryglewski, R.J.: Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI_2) biosynthesis in arteries
Artery 7 : 488-495. 1980.
- SZCZEKLIK, A., Gryglewski, R.J. Domagala, B., Zmuda, A., Hartwich, J., Wozny, E., Grzywacz, M., Madej, J., Gryglewska, T.: Serum lipoproteins, lipid peroxides and prostacyclin biosynthesis in patients with coronary heart disease
Prostaglandins 22 : 795-807. 1981.
- TENGVAR, C., Forssén, M., Hultström, D., Olsson, Y., Partoft, H., Petterson, A.: Measurement of edema in the nervous system. Use of Percoll density gradients for determination of specific gravity in cerebral cortex and white matter under normal conditions and in experimental cytotoxic brain edema
Acta Neuropathol. (Berlin) 57 : 143-150. 1982.
- TENGVAR, C., Hulström, D., Olsson, Y.: An improved Percoll density gradient for measurements of experimental brain edema. Addition of sucrose to an isotonic gradient in an attempt to balance osmotic conditions during density determinations
Acta Neuropathol /Berl./ 61 : 201-206. 1983.

- TERPSTRA, A.H.M., Woodward, C.J.H. and Sanchez-Muniz, F.J.: Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum
Anal. Biochem. 111 : 149-157. 1981.
- THAFVELIN, B.: Role of cereal fat in the production of nutritional disease in pigs
Nature 188 : 1169 - 1172. 1960.
- TOWER, D.B.: Effects of ischemia or tissue hypoxia on the neuron
In: Goldstein, M. et al. (eds.): *Advances in neurology*
Vol. 25., Raven Press, New York, 1979.
- VAN HARREVELD, A., Crowell, J., Malhotra, S.K.: A study of extracellular space in central nervous tissue by freeze-substitution
J. Cell Biol. 25 : 117-137. 1965.
- VASILE, E., Simionescu, M., Simionescu, N.: Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium in situ
J. Cell Biol. 96 : 1677-1689. 1983.
- VESSELINOVITCH, D., Wissler, R.W., Dzoga, K., Hughes, R.H. and Dubien, L.: Regression of atherosclerosis in rabbits, Part 1.
Atherosclerosis 19 : 259. 1974.
- VESSELINOVITCH, D., Fischer-Dzoga, K.: Techniques in pathology in atherosclerosis research
Adv. Lipid Res. 10 : 1-63. 1981.
- WISE, W.M., Schuier, F.J., Hossmann, K.-A., Takagi, S., Zülch, K.J.: Cerebral microembolization 1. Pathophysiological studies
Archives of Neurology 34 : 660-665. 1977.
- VOS, J. et al.: On the cellular origin and development of atheromatous plaques. A light and electron microscopic study of combined X-ray and hypercholesterolemia-induced atheromatosis in the carotid artery of the rabbit
Virchows Arch. Abt. B. Cell. Pathol. 43 /1/ : 1-16. 1983.
- WALKER, J.A. and Wheeler, K.P.: Polar head-group and acyl side-chain requirements for phospholipid-dependent ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase
Biochim. Biophys. Acta 394 : 135-144. 1975.
- WALTER, R.F.: Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper
Arch. Psychiat. Nervenkr. 101 : 195-230. 1933.
- WARHURST, G. and Wynn, C.H.: Subcellular changes associated with culture of chinese hamster fibroblasts in hyperlipemic medium
Atherosclerosis 38 : 383. 1981.

- WEIBEL, E.R. and Palade, G.E.: New cytoplasmic components in arterial endothelia
J. Cell Biol. 23 : 101-112. 1964.
- WHETTON, A.D., Gordon, L.M. and Houslay, M.D.: Elevated membrane cholesterol concentration inhibits glucagon - stimulated adenylate cyclase
Biochem.J. 210 : 437-449. 1983.
- WOERNER, C.A.: Vasa vasorum of arteries, their demonstration and distribution
In: A.I. Lansing (ED.)
The arterial wall, Bailière, Tindall and Cox, London 1959. pp. 1-14.
- YAGI, K.: Lipid peroxides in biology and medicine
Acad. Press, New York, 1982., pp. 223-242.
- YAHUACA, P., Amaya, A., Rojkind, M. and Mourelle, M.: Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios
Lab. Invest. 53 : 541-545. 1985.
- YAMAGUCHI, K., Hguygen-Phu, D., Scheid, P. and Piiper, J.:
Kinetics of O₂ uptake and release by human erythrocytes studied by a stopped-flow technique
J.Appl.Physiol. 58 : 1215. 1985.
- YATSU, F.M., Liao, C.-L., and Park, O.H.: Impaired synaptosomal ATPase following ischemia
Neurology 25 : 358. 1975.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki dr. Joó Ferencnek, és dr. Irina Karnushinának /MTA Biológiai Központ, Szeged, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport/ a kísérletek során nyújtott segítségükért, hasznos tanácsaikért, ill. hogy lehetővé tették számomra a munkát Intézetükben. Az állatkísérletek végzésében, a szövettani feldolgozásban, valamint a fotózással kapcsolatos munkákban nagy segítséget nyújtottak Gazdagh Gabriella, Szerletits Mária és Mármárosi Éva asszisztensnők /MTA Biológiai Központ, Szeged, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport/, valamint dr. Hedrich Károlyné /Megegyei Kórház, Kecskemét, Patológiai Osztály Kísérletes Részlege/ az agyórz gélelektrofozézis vizsgálatok elvégzésében. Köszönöm dr. Ádám Gézáknak /MTA Biológiai Központ, Szeged, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport/ az adenilcikláz, dr. Dux Lászlónak pedig /SZOTE Biokémiai Intézet/ az ATPáz mérések elvégzését. Szintén köszönettel tartozom dr. Farkas Tibornak /MTA Biológiai Központ, Szeged, Genetikai Intézet/ a koleszterin, foszfolipid és zsírsav meghatározásokért, valamint értékes tanácsaiért. Ezúton szeretném megköszönni dr. Szerdahelyi Péternek /SZOTE Központi Laboratórium/ az atomabszorpciós mérések elvégzését, dr. Temesvári Péternek /SZOTE Gyermekklinika/ az Evans kék fotometriás meghatározást, dr. Raskó Istvánnak /MTA SZBK Genetikai Intézet/ a sejttenyésztő munkával való megismerttetést, valamint hogy laboratóriumában lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzésére. Köszönet illeti Forgács Györgyi asszisztensnőt és Kis Mihályné gépírónőt a dolgozat legépeléséért, valamint Némethné Süttő Anikót a képek elkészítéséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni főnökömnek, Prof. dr. Lusztig Gábornak /Megyei Kórház, Kecskemét, Patológiai Osztály/, hogy hozzájárult a Szegeden töltött 11 hónapos Nemzetközi Továbbképző Tanfolyamon való részvételemhez, az itt végzett kísérletekhez, majd ezt követően is támogatta a Szegedi Biológiai Központban folytatott munkámat és értékes tanácsaival hozzájárult ennek a dolgozatnak az elkészültéhez.

