

Szakmai beszámoló a K68976 sz. tematikus OTKA pályázatról

Vizsgálataink középpontjában az érett újszülöttek átmeneti agyi vérellátás vagy oxigénellátás zavarai nyomán kialakuló ún. hipoxiás-iszkémiás enkefalopátia (HIE) pathomechanizmusának kutatása és lehetséges neuroprotektív stratégiák kidolgozása áll. A HIE során megfigyelhető neuronkárosodás nemcsak az idegsejtekre gyakorolt direkt lézió következménye, hanem az agyi parenchyma metabolikus homeosztázisáért felelős összes sejtípus, az ún. neurovaszkuláris egység diszfunkciója is jelentős szerepet játszik ebben a folyamatban. Vizsgálatainkban ezért a neurovaszkuláris egység különböző sejtípusait embrionális szövetből vagy újszülött állatokból származó sejttenyészeteken, ill. in vivo állatkísérletekben, az érett humán újszülött elfogadott állatkísérletes modelljében, újszülött malacban vizsgáltuk. Főbb kísérleti eredményeinkről az alábbiakban számolok be.

### **1. A mitokondriális ATP-szenzitív $K^+$ csatorna (mito $K_{ATP}$ ) aktiválásával létrehozott neuroprotekción.**

Korábbi vizsgálataink arra utaltak (Gaspar et al. 2008b), hogy a (mito $K_{ATP}$ )-nyitó BMS191095-tel kialakított prekondicionálás fokozza a kataláz expressziót, illetve a BMS191095 prekondicionálás neuroprotektív hatása a kataláz-gátló 3 aminotriazolal részlegesen gátolható. A kataláz-expresszió szerepének tisztázására primer patkány agykérgi neuronkultúrában megvizsgáltuk, hogy a kataláz expresszió növelése adenovirális kataláz-transzfeccióval létrehozza-e a prekondicionált fenotípust. Eredményeink szerint a kataláz-szint és aktivitás jelentős emelése neuroprotektív a hidrogén-peroxiddal létrehozott sejthalál ellen, azonban nem befolyásolta jelentős mértékben az oxigén-glükóz depriváció (OGD) ill. az L-glutamát neurotoxikus hatását (Gaspar et al. 2009a). Mivel a BMS191095 prekondicionálás sikerrel védi ki az OGD vagy az L-glutamát által indukált neurotoxicitást, a kataláz expresszió növekedése önmagában nem magyarázza a prekondicionálás neuroprotektív hatását. Sajnos a BMS-191095 nevű farmakon a molekulát fejlesztő gyógyszerügyi kutatócsoport felszámolása miatt elérhetetlenné vált, így az ezzel a molekulával tervezett in vivo kísérleteink meghúsultak, és ezért más káliumcsatorna nyitók alkalmazásával folytattuk kísérleteinket. A prototípus mito $K_{ATP}$  nyitó diazoxid a korábbi malacban végzett pozitív eredmények után újszülött patkányban is jelentősen csökkentette az iszkémiával vagy excitotoxikus stresszel létrehozott retina-degenerációt igazolva a hatás in vivo effektivitását (Atlasz et al. 2007). Megvizsgáltuk továbbá, hogy a nagykonduktanciájú

kalcium-szenzitív káliumcsatorna ( $BK_{Ca}$ ) aktivátor NS1619 létrehoz-e a BMS-191095-höz hasonló farmakológiai prekondicionálást idegsejteken. Azt az eredményt kaptuk, hogy bár az NS1619 effektíven indukál akut vagy késleltetett prekondicionálást, az NS1619 hatása független a  $mitoK_{ATP}$  és a  $BK_{Ca}$  aktivációtól is (Gaspar et al. 2009b; Gaspar et al. 2008a). Eredményeink inkább azt a feltételezést támasztják alá, hogy a specifikusnak tartott farmakonok számos intracelluláris (talán mitokondriális) hatást is kifejtenek, melyek képesek az idegsejteket a naiv/hipoxia-érzékeny - prekondicionált/hipoxia-rezisztens fenotípusváltásra készíteni. Eredményeinket összefoglaló formájában is megjelentettük (Busija et al. 2008)

A  $mitoK_{ATP}$  aktiváló anyagok az idegsejtek mellett az agyi erekre is direkt hatást fejtenek ki. Izolált agyi artériákban kimutattuk, hogy a  $mitoK_{ATP}$  nyitó diazoxid a vaszkuláris simaizomsejtekben mitokondriális depolarizációt, reaktív oxigén speciesz (ROS) felszabadulást, és részben érendotélium-függő, nitrogén oxid (NO) mediált vazodilatációt hoz létre. A kialakuló válasz gátolható a ROS közömbösítésével, endotélium sértéssel, az NO szintáz gátló L-NAME-mel, ill iberiotoxinnal, a kalcium-szenzitív  $K^+$  csatornák gátlószerével (Katakam et al. 2009).

## **2. A rozuvasztatin ( $mitoK_{ATP}$ ) aktiváló hatásának vizsgálata.**

Irodalmi adatok alapján felmerült, hogy a klinikumban széles körűen elterjedt statinok közé tartozó rosuvastatin számos ún pleiotróp hatása egyikeként kifejti-e a  $mitoK_{ATP}$  nyitókhöz hasonló esetleg a  $mitoK_{ATP}$  -n át megvalósuló prekondicionáló/neuroprotektív hatást. Eredményeink szerint a rosuvastatin létrehozhat a BMS191095-höz hasonló késői prekondicionálást, meggátolva az oxigén-glükóz depriváció neurotoxikus hatását. A hatás létrehozásában nem a neuronális koleszterolszint csökkenése, hanem az ugyancsak a mevalonsavból keletkező geranilgeranil-pirofoszfát depléciója, és a következményesen gátlódó fehérje-geranilgeraniláció lehet a felelős. A rozuvasztatinnal létrehozott neuroprotektíót a geranilgeraniltranszferáz gátló perillsav is létrehozza. A prekondicionált fenotípust jellemzi a neuronális mitokondriumok mérsékelt depolarizációja, mely utal a  $mitoK_{ATP}$  aktivációra, de szemben a BMS191095 -sel kiváltott prekondicionálással, a neuronális ATP szint is csökkenést mutat (Domoki et al. 2009a). Megállapítottuk, hogy a rosuvastatin előkezelés nemcsak az oxigén-glükóz depriváció, hanem a glutamát neurotoxikus hatásával szemben is kialakít rezisztenciát. Azonban a protektív hatás mechanizmusa teljességgel különbözik, hiszen a glutamáttal szembeni védőhatás független a rosuvastatin hidroximetilglutarát-CoA reduktáz gátló hatásától. Kimutattuk, hogy a 3 napig rozuvasztatinnal prekondicionált idegsejtekben csökken a glutamáttal kiváltható intracelluláris szabad

kalciumszint-emelkedés és a ROS termelődés, mely közvetlen oki kapcsolatban állhat a megfigyelt neuroprotektív hatással (Domoki et al. 2010a). Hasonló nem-specifikus eredményt kaptunk, mint a BK<sub>Ca</sub> nyitó NS-398-cal végzett akut prekondicionálással is. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a specifikusnak tartott farmakonok számos intracelluláris (talán mitokondriális) hatást is kifejtenek.

### **3. A neurovaszkuláris egység funkciójának vizsgálata újszülött malacban**

Jól ismert, hogy hipoxiás/iszkémiás stresszt követően károsodik az agykérgi mikroerek válaszkészsége, csökken a cerebrovaszkuláris reaktivitás. A neurovaszkuláris funkció tesztelésére egyrészt az endothelium-függő hiperkapniával kiváltott vazodilatációt, ill. az NMDA által létrehozott neurovaszkuláris választ használjuk. A szakirodalomban megjelent feltételezések alapján meg kellett vizsgálnunk, hogy az iszkémiás stresszt követő endotheliális diszfunkciót létrehozhatja-e excitotoxikus hatás. Megállapítottuk, hogy a mikrovaszkuláris endotélsejtek funkciója még igen magas glutamátkoncentrációk alkalmazásakor sem károsodik in vivo vagy in vitro, tehát nem a glutamát felelős a kialakuló endotél-diszfunkcióért (Domoki et al. 2008a). Mivel a klinikumban az agyi vaszkuláris rezerv vizsgálatára a hiperkapnia helyett inkább a szénsavanhidrázgátló acetazolamidot használják, külön kísérletsorozatban győződünk meg, hogy a két módon kiváltott vazodilatáció mechanizmusa lényegében identikus (Domoki et al. 2008b). Az NMDA-val kiváltott vazodilatációval egyébben végzett vizsgálatok alapján felmerült, hogy a vazodilatációért valójában egy kiváltott kúszó kérgi depolarizáció felelős. Külön kísérletsorozatban vizsgáltuk ezért az agyfelszínre juttatott NMDA elektrofiziológiai és vaszkuláris hatásait, és sikerült igazolni, hogy újszülött malacban – szemben a patkánnyal – az NMDA-applikáció nem hoz létre kúszó kérgi depolarizációt (Lenti et al. 2009a). A BMS191095 hozzáférhetetlensége miatt újabb, feltehetően neuroprotektív stratégiákat próbáltunk ki, hogy mérsékl-e a neuronális-vaszkuláris érreaktivitás károsodását iszkémia/reperfúziót követően. Megállapítottuk, hogy a szekretoros foszfolipáz-A2 inhibitor PX-18 nanoszuszpenzió önmagában nem befolyásolta, viszont megvédte a hiperkapniával, bradikininnel vagy NMDA-val kiváltott arteriola dilatációt I/R-t követően (Domoki et al. 2009b). Ugyancsak megállapítottuk, hogy szub-vazoaktív dózisban a vazoaktív intesztinális polipeptid és a pituiter adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) is kifejti vaszkuláris protektív hatást I/R után (hiperkapniával kiváltott vazodilatáció), azonban a neuronális-vaszkuláris érreaktivásra csak a PACAP fejt ki protektív hatást (NMDA-val kiváltott neuroprotektív hatás) (Lenti et al. 2009b). Legígéretesebbnek azonban legutóbbi eredményeink tűnnek, melyek szerint a hipoxiás inzultust követően

megkezdett hidrogéngázzal kiegészített levegővel végzett lélegeztetés kivédi a neurovaszkuláris diszfunkció kialakulását és a hisztopatológiai érékelés alapján neuroprotektív hatású is (Domoki et al. 2010b). A hidrogén gáz ex vivo körülmények között a legagresszívabb toxikus oxigénmetabolitok szelektív antagonistája (Ohsawa et al. 2007). Mivel ebben a kísérletsorozatban a hipoxiás periódust követően kezdődött a terápiás beavatkozás, a pozitív eredmények további transzlációs jellegű kutatások szükségességét vetik fel. A hidrogén jótékony hatását globális iszkémiát követően rágcslómodellben is sikerül igazolnunk (Hugyecz et al. 2011).

Fent részletezett kísérleti eredményeinkről 16 *in extenso* és 2 összefoglaló folyóiratcikkben számoltunk be, melyeknek összesített impakt faktora: 62.921. Az elvégzett kutatások jelentős mértékben hozzájárultak Dr. Gáspár Tamás, Dr. Zimmermann Aliz, Dr. Lenti Laura, és Dr. Mracsó Éva Ph.D. fokozatszerzéséhez. Ezen kívül, a kutatásokban részt vevő diákkörös hallgatóink a helyi és országos TDK konferencián 10 előadással szerepeltek.

Kérem az OTKA szakzsűrit, hogy beszámolómat elfogadni szíveskedjen.

Szeged, 2012 január 31.

Dr. habil. Domoki Ferenc  
egyetemi docens

#### Irodalomjegyzék:

- Atlasz T, Babai N, Reglodi D, Kiss P, Tamas A, Bari F, Domoki F, Gabriel R. (2007) Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res* 12:105-111
- Busija DW, Gaspar T, Domoki F, Katakam PV, Bari F. (2008) Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1471-1477
- Domoki F, Kis B, Gaspar T, Bari F, Busija DW. (2008a) Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1099-1108
- Domoki F, Kis B, Gaspar T, Snipes JA, Bari F, Busija DW. (2010a) Rosuvastatin induces delayed preconditioning against L-glutamate excitotoxicity in cultured cortical neurons. *Neurochemistry International* 56:404-409

- Domoki F, Kis B, Gaspar T, Snipes JA, Parks JS, Bari F, Busija DW. (2009a) Rosuvastatin induces delayed preconditioning against oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C97-105
- Domoki F, Olah O, Zimmermann A, Nemeth I, Toth-Szuki V, Hugyecz M, Temesvari P, Bari F. (2010b) Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr Res* 68:387-392
- Domoki F, Zimmermann A, Lenti L, Toth-Szuki V, Pardeike J, Muller RH, Bari F. (2009b) Secretory phospholipase A2 inhibitor PX-18 preserves microvascular reactivity after cerebral ischemia in piglets. *Microvasc Res* 78:212-217
- Domoki F, Zimmermann A, Toth-Szuki V, Busija DW, Bari F. (2008b) Acetazolamide induces indomethacin and ischaemia-sensitive pial arteriolar vasodilation in the piglet. *Acta Paediatr* 97:280-284
- Gaspar T, Domoki F, Lenti L, Institoris A, Snipes JA, Bari F, Busija DW. (2009a) Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures. *Brain Res* 1270:1-9
- Gaspar T, Domoki F, Lenti L, Katakam PV, Snipes JA, Bari F, Busija DW. (2009b) Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res* 1285:196-207
- Gaspar T, Katakam P, Snipes JA, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW. (2008a) Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J Neurochem* 105:1115-1128
- Gaspar T, Snipes JA, Busija AR, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW. (2008b) ROS-independent preconditioning in neurons via activation of mitoK(ATP) channels by BMS-191095. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1090-1103
- Hugyecz M, Mracsko E, Hertelendy P, Farkas E, Domoki F, Bari F. (2011) Hydrogen supplemented air inhalation reduces changes of prooxidant enzyme and gap junction protein levels after transient global cerebral ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res* 1404:31-38
- Katakam PV, Domoki F, Snipes JA, Busija AR, Jarajapu YP, Busija DW. (2009) Impaired mitochondria-dependent vasodilation in cerebral arteries of Zucker obese rats with insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R289-298
- Lenti L, Domoki F, Gaspar T, Snipes JA, Bari F, Busija DW. (2009a) N-Methyl-D-Aspartate Induces Cortical Hyperemia through Cortical Spreading Depression-Dependent and -Independent Mechanisms in Rats. *Microcirculation* 16:629-639
- Lenti L, Zimmermann A, Kis D, Olah O, Toth GK, Hegyi O, Busija DW, Bari F, Domoki F. (2009b) PACAP and VIP differentially preserve neurovascular reactivity after global cerebral ischemia in newborn pigs. *Brain Res* 1283:50-57
- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13:688-694