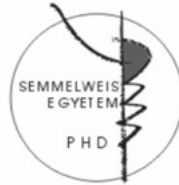


# Mitokondriális neuroprotekcio

Doktori tizisek

**Dr. Szilágyi Géza**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Nagy Zoltán, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Sándor osztályvezető főorvos, PhD.  
Dr. Kovács Tibor egyetemi docens, PhD.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sándor Péter, egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Feteke István egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Bartha Katalin tud. mts, PhD.

Budapest, 2008

## Bevezetés

A fokális agyi ischaemiát leggyakrabban az intra- és extrakraniális agyi artériák tromboembóliája vagy atherothrombotikus elzáródása okozza. A patológiai kimenetel egyaránt függ az ischaemia mértékétől és idejétől. Amikor a véráramlás egy bizonyos szint alá csökken, egy sor biokémiai folyamat indul el, mely az agyi funkciók elvesztéséhez, majd a sejtek pusztulásához vezet. Az oxigén és glükóz szint csökkenése energiakrízishez vezet, amit az ATP, foszfokreatin és a glikogén gyors elfogyása jellemez. Ezen túl az anaerob glikolízis laktátot termel, ami acidózist okoz. Az energiakrízis az ischaemiás szövetben membrán depolarizációt okoz következményes ionzavarokkal: toxikus mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés a citoplazmában és extracellulárisan  $\text{K}^{+}$  szint emelkedés. A keringés helyreállásával az oxigénellátás javul, ami a normálshoz képest többszörös szabadgyök (ROS) termelést indít el. Ezek a folyamatok a sejtek károsodásához, illetve pusztulásukhoz vezetnek. Az hogy egy sejt nekrozis vagy apoptózis útján pusztul el, két fő tényezőtől függ: a károsító hatás nagyságától és a sejtek ATP termelési képességétől, mivel ugyanis az apoptózis energiaigényes folyamat.

Disszertációmban ezen folyamatok vizsgálatával és gyógyszeres beavatkozás eredményeivel foglalkozok.

## Célkitűzések

Munkám során a neurológiai kezelésben régóta használt vinpocetin és deprenyl neuroprotektív hatását vizsgáltam. Mindkét molekuláról ismert volt ez a hatása, de a pontos mechanizmusáról ellentmondásos adatok jelentek meg. A célkitűzéseim a következők:

- egyesített szabadgyök és mitokondriális transzmembrán potenciál mérésére szolgáló metodika kialakítása és validálása,
- a vinpocetin dózisfüggő hatásának vizsgálata sejtpusztulás, ROS és MMP mérés alapján,
- PET vizsgálattal igazolni a vinpocetin kötését és a PBR receptorhoz, illetve stroke-ot elszenvedő betegek agyában a vinpocetin kezelés után meghatározni a glükóz metabolizmus és véráramlás pontos regionális változását,
- PC-12 sejttenyészetben vizsgálni a deprenyl és deprenyl-N-oxid dózisfüggő neuroprotektív hatását,
- a deprenyl és deprenyl-N-oxid antiapoptotikus hatását vizsgálni patkány és egér agyi stroke modellben,
- a deprenyl fő metabolikus útvonalának gátlásával bizonyítani, hogy a deprenyl-N-oxid az aktív metabolit.

## Módszerek

### Állatkísérletek

A kísérletek során 320-460 g testtömegű hím Wistar patkányokat, 40-60 g tömegű hím Mongol Gerbil egereket, illetve 4.0-7.1 kg tömegű nőtény makákó majmokat használtunk. Az állatokat az Európai Unió megfelelő rendelkezéseivel összhangban tartottuk és kezeltük. A kísérleti folyamatot a helyi (Budapesten és Stockholmban) Etikai Bizottság megvizsgálta és elfogadta.

### Permanens cerebri media okklúzió patkányban

A kísérleti állatok 320–460 g testtömegű hím Wistar patkányok voltak. A kísérleti állatokat 4% halotánnal altattuk, majd a mély narkóziót 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> keverékében 2–2,5% halotánnal tartottuk fenn, maszk segítségével. A pMCAO kivitelezéséhez standardizált technikát használtunk. Az ischaemiás léziót a bal oldali artéria cerebri media (MCA) agyfelszínen végzett elektrokoagulálásával hoztuk létre. Körülbelül 3 mm átmérőjű csontablakot készítettünk éppen a bal oldali artéria cerebri media felett. Eltávolítottuk a dura matert. Ezt követően azonosítottuk az artéria cerebri mediát, majd bipoláris koagulátor segítségével elzártuk a fő ágait. A koagulálás után az agyfelszínt Spognostane-val fedtük be, majd előbb az izmokat varrtuk össze, utána pedig a sebfelszínt zártuk le. A műtét után az állatokat visszahelyeztük a ketrecbe.

Kétoldali, átmeneti artéria carotis interna lekötése egérben

A kísérleti állatok 40-60 g testtömegű hím Gerbil egerek voltak. A kísérleti állatokat 4% halotánnal altattuk, majd a mély narkózist 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> keverékében 2–2,5% halotánnal tartottuk fenn, maszk segítségével. A nyakon középvonalí metszés után mindkét oldalon a carotis internát kipreparáltuk, úgy hogy a mellette futó vagus ideg sértetlen maradjon. A preparálás után Codman aneurysma mikroklippel 10 percre lezártuk a keringést mindkét oldalon. 10 perc után a klippeket eltávolítottuk és ellenőriztük, hogy a carotisokban a keringés elindult-e. A nyaki bőrseb zárása után az altatást befejeztük és ébredés után az állatokat visszahelyeztük a ketrecekbe.

PC-12 sejtenyészet

PC 12 (ATCC, Manassas, VA, USA) sejteket DMEM tápoldatban tenyésztettük, mely 10% borjú és 5% lószérumot, 2 mM L-glutamint, 50 IU/ml penicillint és 50 UI/ml streptomycint tartalmazott. A sejteket a 24 lyukú tenyésztő lemezre helyeztük, a lyukak átmérője 15 mm. Minden egyes lyukba patkány farokból izolált kollagénnel bevont kerek üveglemezt helyeztünk, erre növesztettük rá a sejteket. NGF kezeléssel a PC 12 tenyészetet differenciáltattuk 5 napig.

Hypoxia-reoxigenizáció PC-12 sejtenyészetben

A 24 lyukú edényben tenyésztett sejtek fölé argon gázt rétegeztünk, így elvonva az oxigént. Egy órás beavatkozás hatására a tápoldatban mért  $154.65 \pm 1.35$  Hgmm-es parciális oxigén nyomás  $51.96 \pm 2.53$  Hgmm-re esett le, ezzel kb. 30%-os oxigén szintet értünk el. A hypoxiát követően az argon gázt eltávolítottuk a tenyészetéről, majd

24 órára normál termosztátba helyeztük, ez volt a reoxigenizációs időszak. A kontroll sejtek folyamatosan a termosztátban voltak normál oxigén szint mellett.

#### TTC festés

Az állatok agyát eltávolítottuk, felszeleteltük, majd a károsodott szövetek térfogatának méréséhez a 2 mm vastag, friss agyszeleteket 2,3,5-trifeniltetrazólium-klorid reakcióval (TTC-módszer) megfestettük. A TTC-reakció pirosra festi a mitokondriális dehidrogenázokat. A fehéren maradt, nem festődött területet infarcerálódott agyszövetként azonosítottuk. Ezt követően a TTC-vel festett agyszeleteket lefényképeztük, a fényképeket digitalizáltuk, majd a lézió területét számítógépes morfometria segítségével az egyes agyszeletekben meghatároztuk. A művelet során az UTHSCA ImageTool nevű programot használtuk. Az egyes állatok infarktuszának térfogatát mm<sup>3</sup>-ben kaptuk meg, a szeletvastagság és az infarcerálódott terület szorzatát összegezve, az adott állatból származó agyszeletekre nézve.

#### Propidium jodid festés

A 24 órás reoxigenizáció után a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd 1.5 µg/ml-es koncentrációjú propidium jodid oldattal 2 percig festettünk. Az élő és halott sejteket 490nm-es fényt kibocsátó fluoreszcens mikroszkópban számoltuk meg 585nm-es szűrő mellett. A sejtpusztulás mértékét százalékos értékben adtuk meg az összes leszámolt sejthez képest.

## Immunhisztokémia

### TUNEL/Kaspáz-3 festés.

A 10%-os paraformaldehydiben való fixálás, valamint a paraffinba való beágyazás után 6 µm-es metszeteket készítettünk a kísérleti állatok agyából. Minden állatból a hippocampuszról 4 db 1 mm távolságú síkban 3-3 metszetet készítettünk. A konfokális lézerpásztázó mikroszkópos (CLSM) tanulmányozáshoz előtisztított, szilánózott lemezekre vittük fel a deparafinált metszeteket. Az infarktus körüli régióban található apoptotikus sejtek azonosításához a törött DNS-végeket fluoreszcens TUNEL kit segítségével jelöltük meg (F. Hoffmann- La Roche Ltd, Basel, Switzerland). Ezzel egyidejűleg kaspáz-3 primer antitesttel (Immunotech, egér anti-kaspáz-3, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) 1:500-as hígításban és Alexa 568 másodlagos antitesttel (kecske anti-egér Alexa 568, Molecular Probes, Invitogen GMBH, Austria) 1:200-as hígításban fluoreszcens immunhisztokémiát is végeztünk. A festés folyamán nem használtunk antigén felfedő előkezelést, ezért az alapszintű kaspáz-3-kifejeződést nem detektáltuk, a permanens artéria cerebri media okklúziót követő fokozódott kaspáz-3-expressziót viszont regisztráltuk.

### PBR immuncitokémia.

A PBR receptor denzitás meghatározására immunfestést használtunk a PC 12 sejtekben. 0.25% paraformaldehyd 2 perces fixálás után PBS-sel kétszer átmostuk a tenyészetet. Anti-PBR elsődleges

antitesttel (nyúlban termelt anti-PBR antitest, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) egy óráig festettünk 1:500-as hígításban, majd PBS lemosás után a FITC jelölésű másodlagos fluoreszcens antitesttel (kecske anti-nyúl IgG FITC, Molecular Probes, Invitogen GMBH, Austria) kezeltük a sejteket 1:200-as hígításban.

Szabadgyök festés és a mitokondrium transzmembrán potenciál meghatározás PC-12 sejtekben

A két festési módszert módosítottuk és egy közös festést hoztunk létre. Emiatt ebben a fejezetben együtt tárgyaljuk a festéseket. A korábban kidolgozott módszerekkel jól mérhetjük a ROS mennyiségét, de egyik sem ad jó vizualizációt a ROS sejten belüli eloszlásáról. Az utóbbi években, a konfokális lézer szkennig mikroszkópia elterjedésével új ROS kimutatási módszerre nyílt lehetőség. A cérium klorid ( $CeCl_3$ ) molekula a külső elektronhéjon keringő párosítatlan elektron miatt rendkívül könnyen reakcióba lép a szabad gyökökkel. Ebből a reakcióból cérium-perhidroxid molekula keletkezik, amely fényvisszaverő tulajdonságú, oldhatatlan csapadék. Ezt a fényvisszaverő tulajdonságot lehet kihasználni a CLSM reflexiós üzemmódjában. Ezt a módszert egészítettük ki egy másik mitokondriális modalitással, az MMP mérésével.

Festés leírása: A DMEM-t eltávolítottuk, majd 300  $\mu$ l, 10  $\mu$ g/ml koncentrációjú JC-1 (Molecular Probes, Invitogen GMBH, Austria) festéket adtunk a sejtekhez 10 percig. Ezután a sejt kultúrát fiziológiás sóoldattal mostuk át. Majd két percig festettünk ismét 300  $\mu$ l mennyiségű, 20 mmol/l koncentrációjú Ringer-laktátban feloldott  $CeCl_3$ -dal (Sigma-Aldrich Co, St. Luis, MO, USA). A



CeCl<sub>3</sub> oldat eltávolítása után ismételten fiziológias sóoldattal öblítettük át a sejteket. Ezután 0.25%-os glutáraldehiddel fixáltuk a sejteket 2 percen keresztül. A kerek üveglemezen fixált sejteket Vectashield fluoreszcens lefedővel (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) tárgylemezre rögzítettük.

Konfokális lézer szkennig mikroszkópia

A vizsgálataink nagy részében fluoreszcens festési módszert használtunk. Ennek a detektálására konfokális lézer szkennig mikroszkópot használtunk, amely egy Nikon OPTIPHOT mikroszkópra telepített (Donsanto Corp., Nattick, Massachusetts) BIO-RAD MRC 1024 konfokális rendszer (Bio-Rad Corp., Hertfordshire, England).

Képkötoás a PC-12 sejttényészetben

A vizsgálatok során PC-12 sejttényészetben JC-1 és CeCl<sub>3</sub> kettősfestést és PBR immunfestést mértünk konfokális mikroszkópiával. Általános szabályként alkalmaztuk, hogy az összes mérésnél mindig használtunk saját kontrol csoportot, amihez a mért értékeket viszonyítottuk. Ezzel elkerülhető a szabadyök és a mitokondrium membránpotenciál mérésnél a más-más napon használt tényészetben feltételezhető eltérésekből származó hiba, annak ellenére, hogy a tényészetés, a kezelés és a festési eljárások standard módon történtek. A különböző mérési beállításokat rögzítettük és mérés közben nem változtattunk raja.

Vegyük sorra a mérési beállításokat. A JC1 festés során 488 és 568 nm-es gerjesztést, T1 és T2a 560 DRLP tükröket, 522 DF35, illetve 585 LP emissziós szűrést használtunk. A JC-1 monomer formája

ilyen beállítás mellett zöld fluoreszcens jelet, míg a J-aggregátum pedig piros jelet ad. A CeCl<sub>3</sub> festett sejtek detektálása során a konfokális mikroszkóp reflexiós üzemmódját használjuk: 488 nm-es gerjesztés, B1 és T1 tükrök és kék-reflexiós szűrő. A BPR immunfestésnél a másodlagos antitest FITC jelzésű így a következő beállítást használtuk: 488 nm-es gerjesztést, T1 és T2a 560 DRLP tükröket, 522 DF35 emissziós szűrést.

A kvantitatív elemzéshez nagy felbontású (820x) képeket készítettünk. Minden mérési csoportban véletlenszerűen 100-100 sejtet fotóztunk le, majd egy beépített software (LaserSharp Processing, Bio-Rad Corp., Hertfordshire, England) segítségével a sejtekben mért átlag intenzitást meghatároztuk.

#### Képalkotás szövettani metszetben

Szövettani metszeteken, mind a patkány, mind az egér kísérletekben TUNEL/Caspase-3 immunfestést használtunk 6 µm vastag fixált metszeteken. Az egyidejű képalkotásnál a TUNEL festés zöld jelet adott a FITC fluoreszcens festés miatt, míg a Caspase-3 esetén piros jelet kaptunk az Alexa 568-as másodlagos antitest miatt. Az alábbi beállítást használtuk: 488 és 568 nm-es gerjesztést, T1 és T2a 560 DRLP tükröket, 522 DF35, illetve 585 LP emissziós szűrést. A metszetekről nagyfelbontású (60-100x) képeket készítettünk. A TUNEL és Caspase-3 pozitív sejteket automatikusan számoltuk meg az Image J 1.37 software (NIH, USA) segítségével.

## Humán PET vizsgálatok

A vizsgálatot az Európai Unió megfelelő rendelkezéseivel összhangban a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága megvizsgálta és elfogadta. 13 ischaemiás stroke-on átesett vizsgálati személyt vizsgáltunk. Mind az MR, mind a PET vizsgálat során a betegek egyedileg elkészített műanyag sisakot viseltek, hogy a két vizsgálati modalitás azonos síkban készüljön. Az MR vizsgálat Shimadzu SMT100x1.0 T készüléken történt, a PET vizsgálat GE 4096 Plus teljes test pozitron kamerával készült 5 mm-es felbontással és 6.5 mm-es rétegvastagsággal. 10 mCi aktivitású F18-deoxy-D-glucose-t (FDG) használtunk a metabolizmus mérésre, és 45 mCi aktivitású O15-butanolt az agyi véráramlás mérésére. Az aktivitás görbe számításához könyök vénából vettünk vért. A butanol-PET elvégzése után 45 perc késleltetéssel készült el az FDG-PET vizsgálat. A regionális agyi glükóz metabolizmust (CMR<sub>glc</sub>) a PET mérések és az aktivitás görbék alapján határoztuk meg a Kuwabara modell felhasználásával. A butanol (CBF) felvételeket Ohta féle két kompartment modell alapján rekonstruáltuk.

A Karolinska Intézet Human Brain Atlas (HBA) rendszerében az MRI képeket a Talairach koordináta rendszerhez beforgattuk a fő síkok szerint. Ezután az individuális MRI képeket a HBA standard agy kontúrájához torzítottuk, majd az identikus PET képeket is a Talairach koordináta rendszer szerint beforgattuk. Így a két modalitás képei képpontonként teljesen egyeztethetővé váltak. Ezután a standard agyban VOI-kat (volume of interest) határoztunk meg az alábbi agyterületben: jobb és bal félteke, az ép oldalon a frontális, parietális temporális, occipitális kéreg, talamusz, putamen,

lencsemag, kisagy és agytörzs, míg a károsodás oldalán stroke terület, talamusz, kisagy és agytörzs. A VOI-kat felhasználva az egyedi PET képeken a VOI-n belül a parametrikus adatokat (rCBF, rCMRglu) meghatároztuk. Az adatokat ANOVA statisztikai módszerrel elemeztük.

#### Majom PET vizsgálatok

Makákó majmokban határoztuk meg a vinpocetin PBR receptor kötését. A vizsgálatban ECAT EXACT HR47 (Siemens) PET rendszert használtunk, 3.8 mm-es feloldóképességgel. Háromdimenziós üzemmódban 47 horizontális szeletet készítettünk 3.125 mm-s rétegvastagsággal. A majmokat ismételt intramuszkuláris altatószerrel (0.8-1.0 ml/óra, ketamin (KetalarR, Parker-Davis, 50g/ml) és xylazine (RompunR vet, Bayer; 20 mg/ml) 1-1 arányú keverék) altattuk. Az állatokat sztereotaxias fixációval rögzítettük, hogy a mérések azonos pozícióban történjenek. A lábszárbá intravénás kanült helyeztünk be az izotóp beadásához. A 63 perces mérés során az első állat 60 illetve 66 MBq (1.62 és 1.78 mCi) dózisu [11C] PK11195-t, a másik állat pedig 63 illetve 66 MBq (1.70 és 1.78 mCi) dózisu [11C]vinpocetin-t kapott.

A két majom agyi képeit a Karolinska Intézet digitális majom agy atlaszához standardizáltuk. Ezután mértük a teljes és a regionális radioaktivitást az izotóp beadás utáni 9. és 63. perc között. A jelzett vinpocetin és PK11195 felvételét, teljes és regionális kötési potenciálját a Logan féle lineáris analízis alapján határoztuk meg.

## Eredmények

Vinpocetin, deprenyl és deprenyl-N-oxid hatása a sejtpusztulásra.

Vinpocetint  $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$  M-os koncentrációban, a deprenylt  $10^{-3}, 10^{-8}, 10^{-12}$  M-os koncentrációban, míg a deprenyl-N-oxidot  $10^{-5}, 10^{-8}, 10^{-12}$  M-os koncentrációban alkalmaztuk a kísérletek során. Mindhárom molekula esetében koncentrációfüggő hatást mértünk. A legkifejezettebb csökkenést a legkisebb alkalmazott koncentrációban mértük

Vinpocetin, deprenyl és deprenyl-N-oxid hatása a mitokondriális membrán potenciálra (MMP).

JC-1 festés piros és zöld jel arányát határoztuk meg. Ez az arány az MMP-re utal. Mindegyik molekula esetében az MMP növekedés mindhárom kezelt koncentrációban szignifikáns volt.

Vinpocetin, deprenyl és deprenyl-N-oxid hatása a ROS termelésre.

Mindhárom molekulánál koncentrációfüggő ROS termelést csökkentő hatást mutattunk ki. Az alkalmazott koncentrációknál a legkifejezettebb hatást a legkisebb koncentrációban mértük.

DNO hatás időfüggése a mitokondriális membrán potenciálra (MMP). A vizsgált molekulát  $10^{-12}$ M koncentrációban alkalmaztuk a hypoxia előtt és közvetlen utána. Az előkezelt csoportban fél óra múlva, míg az utókezelt csoportban egy óra múlva rendeződött az MMP.

Deprenyl és DNO hatása a perifériás benzodiazepin receptor expresszióra. A kezeletlen normoxiás csoportban a fluoreszcens jel  $0,88 \pm 0,41$ -ről  $0,81 \pm 0,23$ -ra, illetve  $0,45 \pm 0,14$ -re csökkent a deprenyl és DNO csoportban (14. grafikon). A DNO kezelés szignifikánsan csökkentette a PBR expressziót. A hypoxiás csoportokban  $1,26 \pm 0,39$ -ről  $1,1 \pm 0,39$ -re illetve  $0,61 \pm 0,28$ -ra csökkentette a fluoreszcens jel szintjét a deprenyl és a DNO. A DNO hatása szignifikáns volt.

#### Állatkísérleti eredmények

Patkányban permanens cerebri media okklúziós modellben vizsgáltuk a deprenyl neuroprotektív hatását. TTC festéssel határoztuk meg a károsodás térfogatát. A kontroll csoportban  $65,8 \pm 28,6$  mm<sup>3</sup> volt a lézió térfogata, míg a kezelt csoportban ez  $36,5 \pm 24,4$  mm<sup>3</sup>-re szignifikánsan csökkent. Immunfestéssel vizsgáltuk a penumbra régióban az apoptózis mértékét. A TUNEL/kaspáz-3 pozitív sejtek átlagszáma látóterenként a kontroll csoportban  $8 \pm 6$ -ról  $3,3 \pm 3$ -ra szignifikánsan csökkent a kezelt csoportban. A TUNEL jelzett neuronok száma  $9 \pm 7$ -ről  $6 \pm 6$ -ra csökkent a deprenyl kezelés hatására. Ez a változás nem volt szignifikáns.

A Gerbiles kísérletben a negyedik napon az állatok agyát kivettük és immunfestéssel vizsgáltuk a hippocampus területén az ép és apoptotikus sejtek arányát. A CA1 hippocampális régióban a TUNEL/kaspáz pozitív sejtek aránya  $44.8 \pm 15.0\%$  volt a kontroll csoportban, szemben a kezelt csoporttal, ahol  $39.7 \pm 13.1\%$  volt az

apoptotikus sejtek aránya. A CA2 régióban az apoptotikus sejtek aránya  $50.5 \pm 15.6\%$ -ról szignifikánsan csökkent  $41.9 \pm 9.8\%$ -ra.

Humán PET vizsgálat.

Agyi véráramlás változása: A kezelt és kontroll csoportban a teljes agyi CBF érték az infúziós kezelés előtt és után nem változott szignifikánsan. A regionális véráramlás méréseknél a kontroll csoportban a legnagyobb változást a középgyban, a hídban és a kisagyban észleltük, de egyik sem érte el a szignifikancia szintjét. Cavintonnal kezelt csoportban a legnagyobb változás az ellenoldali talamuszban, lencsemagban és a károsodás területében volt, de ezek sem érték el szignifikancia szintjét. A p értékek a Cavintonos csoportban alacsonyabbak (0,12-0,46) voltak, mint a kontroll csoportban (0,5-0,99). Az agyi glükóz metabolizmus méréseknél a kiindulási értékek mind a teljes agyban, mind a különböző régiókban alacsonyabbak lettek az infúziós kezelés után. A metabolikus változások az agy stroke-s oldalán nagyobbak voltak. Ráadásul a placebo csoportban kifejezettebbek voltak. A változások itt sem voltak szignifikánsak.

Majom PET vizsgálat.

[<sup>11</sup>C] PK11195 beadása után a mérés teljes tartama alatt a beadott radioaktivitás csupán a 0,77%-át mértük, míg a 3 mg/kg vinpocetin előkezelés mérésénél csak a 0,6%-át észleltünk. A változás -22%. A [<sup>11</sup>C]vinpocetin beadása után a teljes radioaktivitás 3,84%-át mértük agyban, ezzel szemben az 1 mg/kg PK11195 előkezelés után 5,96%-ra emelkedett a mért mennyiség. Ez 36%-os emelkedést jelent.

## Következtetések

A kapott eredményekből az alábbi következtetések vonatók le.

- egyesített szabadgyök és mitokondriális transzmembrán potenciál mérésére szolgáló metodika jól használható és kvantitatív elemzésre ad lehetőséget,
- vinpocetin dóziszfüggő hatást mutatott a sejtpusztulás, ROS és MMP mérés alapján, a vizsgált legkisebb koncentrációban (10<sup>-7</sup>M) volt a legkifejezettebb a hatás,
- PET vizsgálattal igazoltuk a vinpocetin kötését PBR receptorhoz, illetve pontosan meghatároztuk stroke-ot mmelszenvedő betegek agyában a vinpocetin kezelés után a glükóz metabolizmus és véráramlás pontos regionális változásait,
- PC-12 sejttenyészetben igazoltuk a deprenyl és deprenyl-N-oxid dóziszfüggő neuroprotektív hatását,
- deprenyl és deprenyl-N-oxid antiapoptotikus hatású patkány és egér agyi stroke modellben,
- a deprenyl fő metabolikus útvonalának gátlásával bizonyítottuk, hogy a deprenyl-N-oxid az aktív metabolit.

Rövid összefoglalásként elmondhatjuk, hogy mindkét, évtizedek óta használt gyógyszerrel kapcsolatban teljesen új hatásmechanizmussal foglalkoztunk. Az eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy mindkét molekula az oxigénhiányos állapotokban jelentősen



csökkenti a károsodás mértékét és ezt a mitokondriumon keresztül fejti ki. Eredményeinkkel ezt az új hatásmechanizmust még nem bizonyítottuk teljesen, ezért további vizsgálatokat tervezünk a bizonyítás céljára és az esetleges klinikai alkalmazhatóság vizsgálatára.

## Összefoglalás

A PhD munkám során a vinpocetin, deprenyl és deprenyl-N-oxid sejtvédő hatását vizsgáltam. A vizsgálatokban a molekulák sejtbiológiai és főleg a mitokondriális hatásait írtuk körül. A munkaidőszakom első részében a módszertant dolgoztam ki, mely során két jól ismert metodikát a JC-1 mitokondrium membrán potenciál festést és a CeCl<sub>3</sub> szabadgyök festést módosítottuk és egy közös módszert alakítottunk ki (Géza Szilágyi, László Simon, Péter Koska, Géza Telek, Zoltán Nagy, Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining Neurosci Lett 2006 May;399(3):206-9.). A laboratóriumunkban gyors és könnyen reprodukálható mérési sorozattal (sejtpusztulás, mitokondrium membrán potenciál és szabadgyök mérés) PC-12 sejtenyészetben vizsgáltuk a vinpocetin, a deprenyl és a deprenyl-N-oxid sejtbiológiai hatásait. Ennek során mindhárom molekuláról bizonyítottuk, hogy koncentrációfüggő módon védik a sejteket a hypoxiás károsodástól (Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Telek G, Magyar K, Nagy Z. Low dose (-)deprenyl is cytoprotective: It maintains mitochondrial membrane potential and eliminates oxygen

radicals. Life Sci. 2005 Dec 5;78(3):225-31.). A vinpocetin PET vizsgálataiban egy feltételezett, új hatásmechanizmusát, a PBR receptor kötését vetettük fel és bizonyítottuk azt. Ezen mechanizmuson keresztül magyarázhatóvá válik a vinpocetin összes általunk mért sejtbiológiai hatása és a stroke-on átesett betegek agyában mért aerob/anaerob glükóz metabolizmus változása (G. Szilágyi, et al. Effects of vinpocetin on the redistribution of cerebral blood flow and glucose metabolism in chronic ischaemic stroke patients: a PET study J Neurol Sci 2005 May;229-230:275-284). A deprenyl újonnan szintetizált metabolitjáról bizonyítottuk, hogy a derpenylhez hasonlóan védő hatást fejt ki MAO-B független útvonalon. A vizsgálatok alapján feltételezzük, hogy a deprenyl aktív metabolitja valószínűleg a DNO. Deprenyl-N-oxid-dal történt mérések alapján felvetettük a deprenyl egy új hatásmechanizmusát a mitokondriális átmeneti permeabilitási pórus szabályozásán keresztül.

#### A disszertációhoz felhasznált publikációk

1. Simon L., Szilágyi G, Bori Z., Orbay P., Nagy Z.: A (-)deprenyl hatása kísérletes agyi ischaemiában. Agyérbetegségek, 2001.7. (4) p.6-11.
2. Szilágyi G., Nagy Z.: Új módszerek a hypoxia kutatásban Ideggyógyászati szemle 2006;59(11-12):411-415
3. László Simon, Géza Szilágyi, Zoltán Bori, Péter Orbay and Zoltán Nagy (-)-d-Deprenyl attenuates apoptosis in

- experimental brain ischemia. Eur J of Pharma 2001. Nov; 430(2-3):235-41.
4. B. Gulyás, C. Halldin, Á. Vas, RB. Banati, E. Shchukin, S. Finnema, J. Tarkainen, K. Tihanyi, G. Szilágyi, and L. Farde [11C]Vinpocetin: a prospective peripheral benzodiazepine receptor ligand for primate PET studies J Neurol Sci 2005 May;229-230:219-223
  5. G. Szilágyi, et al. Effects of vinpocetin on the redistribution of cerebral blood flow and glucose metabolism in chronic ischaemic stroke patients: a PET study J Neurol Sci 2005 May;229-230:275-284
  6. Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Telek G, Magyar K, Nagy Z. Low dose (-)deprenyl is cytoprotective: It maintains mitochondrial membrane potential and eliminates oxygen radicals. Life Sci. 2005 Dec 5;78(3):225-31.
  7. Géza Szilágyi, László Simon, Péter Koska, Géza Telek, Zoltán Nagy, Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining Neurosci Lett 2006 May;399(3):206-9.

#### A disszertációtól független közlemények

1. Szilágyi G, Szamosi T, Sárai A, Szemerédi P, Nagy Z.: Kumulatív kockázati index a stroke-prevencióban Orvosi Hetilap. 2000 Apr 23; 141(17):901-3.
2. Gubucz István dr., Kakuk Ilona dr., Major Ottó dr., Szegedi Norbert dr., Barsi Péter dr., Pánczél Gyula dr., Varga

- Dániel dr., Ovary Csaba dr., May Zsolt dr., Ricsói Gabriella dr., Kenéz Júlia dr., Szilágyi Géza dr. és Nagy Zoltán dr. Az agykamrába törő vérzések lokális fibrinolízisének biztonságossága és hatékonysága (prospektív, randomizált vizsgálat) *Orvosi Hetlap* 2004. 145(31): 1609-15.
3. B.Gulyás, J. Dobai, G. Szilágyi, G. Csécsei, G. Székely, Continuous monitoring of post mortem temperature changes in the human brain *Neurochem Res* 2006 Feb;31(2):157-66.
  4. Laszlo Denes, Géza Szilágyi, Anikó Gál, Zoltán Bori, Zoltán Nagy, Cytoprotective effect of two synthetic enhancer substances, (-)-BPAP and (-)-deprenyl, on human brain capillary endothelial cells and rat PC12 cells *Life Sci* 2006 Aug 8;79(11):1034-9.
  5. L. Denes, G. Szilágyi, A. Gal, Z. Nagy, Talampanel a non-competitive AMPA-antagonist attenuates caspase-3 dependent apoptosis in mouse brain after transient focal cerebral ischemia *Brain Res Bull* 2006 Jul;70(3):260-2.
  6. Gál A, Szilágyi G, Wappler E, Sáfrány G, Nagy Z. Bcl-2 or Bcl-XL gene therapy reduces apoptosis and increases plasticity protein GAP-43 expression in PC12 cells. *Brain Res Bull* 2007 doi:10.1016/j.brainresbull.2007.11.001