

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az agyi vérkeringés szabályozó mechanizmusainak celluláris kórfolyamatai

Tóth Péter József



Idegsebészeti Klinika

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

2023

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetem Mestereimnek: Koller Ákos professzornak, aki az amerikai évek alatt megtanított, hogy mit jelent a gondolat egyszerűsége, tisztasága, és hogy azt miként lehet elérni. Aki nemcsak tudományos utamon vezetett, aztán állt mögöttem, hanem a barátságával is megtisztelt. Ungvári Zoltán professzornak, aki oklahomai laboratóriumában (igen hosszúra nyúlt kávézások során) megmutatta, miként lehet és kell ötleteket és elképzeléseket tudományosan megközelíteni és megragadni. Köszönöm máig tartó segítségét és támogatását. Büki András professzornak, aki nemcsak bátorította és támogatta a tudományos munkámat a Pécsi Idegsebészetre történő visszatérésem után, hanem megtanított arra a látásmódra, ami idegsebészeti munkám alapja, a küzdelem soha fel nem adására.

Hálás vagyok Schwarcz Attila professzor úrnak, aki klinikai pályám kezdete óta támogat és bíz bennem, és Dóczi Tamás professzor úrnak, akinek köszönhetően a mikroidegsebészet klasszikus elgondolásait és látásmódját megtanulhattam.

Köszönöm munkatársaimnak a New York Medical College-ban, a Reynolds Oklahoma Center on Aging-University of Oklahoma-ban és a Pécsi Tudományegyetem Kóréleti Intézetében és Idegsebészeti Klinikáján, hogy munkámban támogattak és abban részt vettek, segítettek. Klinikai munkámban külön köszönöm Dr. Kuncz Ádám, Dr. Horváth Zsolt és Dr. Kolumbán Bálint segítségét. Köszönöm PhD hallgatóimnak a közös munkát, nagyon sokat tanultam és tanulok tőlük. Hálás vagyok TDK témavezetőmnek, Dr. Degrell Péternek, aki az aprólékos munka fontosságára tanított. Fontos megemlítenem alma mater-emet, a veszprémi Lovassy László Gimnáziumot; különösen hálás vagyok Szelényi Gézáné biológia és Tölgyes Józsefné kémia tanárainak, akik orvosi és természettudományos gondolkodásomat alapozták meg.

Köszönöm Édesanyámnak, Édesapámnak és nagyszüleimnek, amit tőlük kaptam, és amit tovább adhatok gyerekeimnek. Utoljára, de mindenekelőtt Nikinek, Artinak, Petinek, Flórának és Fanninak, hogy szeretetükkel, odaadásukkal és mosolyukkal bevilágítják az életemet.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. Bevezetés	5
<i>I.1. Az agyi véráramlás autoregulációja: az agyi erek nyomás-indukálta myogén válaszána</i> <i>k szerepe</i>	<i>5</i>
1.1.1. Az agyi erek myogén válaszána <i>k szerepe a cerebromikrovaszkulátúra védelmében</i>	<i>5</i>
1.1.2. A nyomás-indukálta myogén válasz celluláris mechanizmusai	<i>6</i>
<i>I.2. A neurovaszkuláris kapcsolás és celluláris mechanizmusai: aktív agyi területek vérellátása</i>	<i>6</i>
II. Célkitűzések	7
III. Az agyi véráramlás autoregulációjának károsodása különböző kórképekben: a konstriktor és dilatátor mechanizmusok egyensúlyának kóros meg bomlása	8
<i>III.1. Agyi autoregulációs diszfunkció hipertóniában és öregedésben: mechanizmus és következmények</i>	<i>8</i>
<i>III.2. Agyi erek myogén autoregulációs működésének károsodása súlyos koponya-agy sérülés után</i>	<i>12</i>
<i>III.3. Az enyhe koponya-agy sérülés fokozza a hipertónia által-indukált cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stresszt – a TBI-indukálta szabadgyök képződés hatékony csökkentése</i>	<i>15</i>
<i>III.4. Az intraluminális nyomás által indukált cerebrovaszkuláris konstriktor és dilatátor útvonalak közötti interakció: agyi erek autoregulációs működése súlyos koponya trauma után egyidejű magasvérnyomás betegség jelenlétében</i>	<i>17</i>
IV. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása: preklinikai modellektől az emberig	20
<i>IV.1. A neurovaszkuláris kapcsolás szerepe a kognitív funkcióban</i>	<i>20</i>
<i>IV.2. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása öregedésben: a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szerepe és annak farmakológiai csökkentése</i>	<i>24</i>
<i>IV.3. Az inzulinszerű növekedési faktor hiánya neurovaszkuláris szét-kapcsolást okoz</i>	<i>27</i>
<i>IV.4. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idős emberekben: az inzulinszerű növekedési faktor szerepe</i>	<i>30</i>
V. Új eredmények összefoglalása	34
VI. A doktori értekezés tézisei a következő publikációkra épülnek	35
VII. Referenciák	36

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

20-HETE: 20-hydroxyeikozatetraén-sav
4-AP: 4-aminopiridin
ACh: acetil-kolin
ACSF: artificial cerebrospinal fluid, arteficiális agy-gerincvelői folyadék
BBB: blood-brain barrier, vér-agy gát
BK_{Ca}: Ca²⁺-által aktivált K⁺ csatorna
CBF: cerebral blood flow, agyi véráramlás
CVR: cerebrovascular resistance, cerebrovaszkuláris rezisztencia
CYP 450 4A: citokróm P-450 4A
Cyp2j6, Cyp2c55: EET-termelő epoxigenázok
Cyp4a10, Cyp4a12, Cyp4a14: 20-HETE termelő ω-hidroxilázok
DCF: CM-H₂DC festék
DHE: dihidroetidium
EET: epoxieikozatrién-sav
fEPSP: field excitatory postsynaptic potential, excitatórikus posztszinaptikus potenciál
GSK1016790A: TRPV4 agonista
HC067047: TRPV4 csatorna blokkoló
HET0016: 20-HETE szintézis gátló
IGF-1: insulin-like growth factor 1, inzulinszerű növekedési faktor-1
INDO: cyclooxygenáz gátló indometacin
L-NAME: NO szintáz inhibitor l-NG-nitroarginin-metil-észter
MCA: arteria cerebri media
MSPPOH: EET szintézis gátló N-(metil-szulfonil)-2-(2-propinil-oxi)-benzol-hexánamid
NO: nitric-oxide, nitrogén-monoxid
NU: neurovascular unit, neurovaszkuláris egység
NVC: neurovascular coupling, neurovaszkuláris kapcsolás
PGE₂: prosztaglandin E₂
Ptgs1: ciklooxygenáz-1
Ptgs2: ciklooxygenáz-2
SHR: spontaneously hypertensive rat, spontán hipertóniás patkány
SKF96365: TRPC6 csatorna gátló
SMC [Ca²⁺]_i: simaizom intracelluláris Ca²⁺ koncentráció
SS-31: Szeto-Schiller peptid (elamipretide)
TBI: traumatic brain injury, traumás agykárosodás
TRPC6: tranziens receptor potenciál csatorna 6
TRPV4: tranziens receptor potenciál vanilloid csatorna 4
U46616: thromboxán (TXA₂) receptor agonista
VCI: vascular cognitive impairment, vaszkuláris etiológiájú kognitív hanyatlás
VSMC: vascular smooth muscle cell, vaszkuláris simaizom sejt
WKY: Wistar-Kyoto patkány

I. Bevezetés

A megfelelő szöveti perfúzió biztosítása az agyi érhálózaton keresztül létfontosságú a normális neuronális működés megőrzéséhez [1-5]. Az agyi véráramlás (cerebral blood flow-CBF) szabályozásának egyedi körülmények között kell biztosítania a megfelelő tápanyag- és oxigénzellőzést, elkerülve az agy hipoperfúzióját és hiperperfúzióját: 1) az agyszövetnek van a legmagasabb metabolikus és oxigénigénye az emberi (és állati) szervezetben; 2) ugyanakkor az idegsejtek nem rendelkeznek elegendő energiatartalékkal; 3) a metabolikus igény gyorsan változik az idegsejtek aktiválásával; 4) a zárt koponyában a tér korlátozott, ezért az átáramlott vérvolumen csak limitáltan emelkedhet az intracraniális nyomás elkerülése céljából; 5) az előbbivel összefüggésben meg kell akadályozni a nagyobb artériás-perfúziós vérnyomás és volumen propagálását az agyi érhálózat disztális, sérülékeny részébe, és az ebből eredő mikrovaskuláris károsodást. E követelmények teljesítése érdekében a CBF szabályozása rendkívül összetett folyamat, több egymást átfedő, egymást különböző szinteken moduláló szabályozási mechanizmus interakciójának eredménye. A CBF szabályozásának két központi mechanizmusa az agyi véráramlás autoregulációja és a neurovaszkuláris kapcsolás.

Ezen mechanizmusok kóros eltéréseinek és azok kórélettani következményeinek, valamint ép és kóros celluláris folyamatainak feltárása volt azon tudományos munkának a vezérlő fonala, ami jelen értekezésnek és téziseinek alapját adja. Élettani, kórélettani, molekuláris biológiai és klinikai vizsgálatainkat olyan betegségekben szenvedő emberekben és a betegségek preklinikai modelljeiben végeztük, amelyeknek jelen korunkban nagy epidemiológiai jelentősége van. Ennek megfelelően a cerebrovaszkulaturát direkt károsító ismert rizikófaktorokon túl (magasvérnyomás) a mai nyugati társadalmakban mindenkit érintő öregedés, valamint a társadalom teljes korfáját szignifikánsan érintő traumás koponya-agy sérülés (traumatic brain injury-TBI) hatásait, azok mechanizmusát, valamint következményeit vizsgáltuk az agyi véráramlás autoregulációs és neurovaszkuláris mechanizmusaira. Ezek könnyebb megértéséhez röviden áttekintem az agyi autoregulációs működés és neurovaszkuláris kapcsolás élettani folyamatait, majd az egyes szabályozó mechanizmusok öregedés-, hipertónia- és TBI-okozta kóros eltérései kerülnek bemutatásra.

I.1. Az agyi véráramlás autoregulációja: az agyi erek nyomás-indukálta myogén válaszána szerepe

A „zárt” koponya térben, ahol a vérvolumen csak szabályozott keretek között változhat az agyszövet számára állandó vérátáramlást kell biztosítani. Ehhez az agyszöveti perfúziót az azt fenntartó szisztémás vérnyomástól (legalábbis adott nyomástartományban) függetleníteni kell. Azon cerebrovaszkuláris mechanizmusok integrált működését nevezzük agyi (nyomás-) autoregulációnak, amelyek a perfúziós-intraluminális nyomás változásai által indukálva negatív visszacsatolással ehhez a nyomás változáshoz igazítják az agyi vaszkuláris rezisztenciát. Ezáltal, az autoregulációs működésnek köszönhetően, a változó perfúziós-intraluminális nyomás széles tartományában (többé-kevésbé) állandó agyi perfúzió (és ezáltal mikrovaskuláris nyomás) jön létre [6]. A cerebrovaszkuláris simaizom sejtek intraluminális nyomás által kiváltott myogén válasza (Bayliss-effektus) kulcsfontosságú mechanizmus a CBF autoregulációjában [7-16]. Ennek megfelelően a vérnyomás csökkenését és/vagy emelkedését követően az agyi artériák és arteriolák aktívan tágulnak és szűkülnek, a nyomásváltozásnak megfelelő vaszkuláris rezisztencia-változást elérve [17-23].

I.1.1. Az agyi erek myogén válaszána szerepe a cerebrómikrovaskulaturá védelmében

A proximális agyi artériák myogén válasza kritikus szerepet játszik a mikrovaskulaturá védelmében. A folyamat a növekvő nyomásváltozáshoz igazított vaszkuláris rezisztencia-növekedésen és következményes nagyobb nyomásesésen keresztül

megakadályozza a nagy nyomás propagációját a disztális agyi vérkeringésbe, megelőzve a mikrocirkuláció nyomás- és volumen túlterhelését [16, 24, 25].

Ennek megfelelően egészséges fiatal egyéneknél és kísérleti állatokon végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy krónikus magas vérnyomás során mind a nagyobb, mind a kisebb ellenállású agyi artériák rezisztenciája megnő [26, 27]. Az ellenállás ezen adaptív változásai miatt a kapilláris nyomás viszonylag állandó marad, a vékonyfalú agyi mikroerek védve vannak a barotraumatól mindaddig, amíg az autoregulációs védőmechanizmusok épek és a vérnyomás a fiziológiai autoregulációs tartományon belül marad. Az autoregulációnak a magas nyomás okozta mikroeringési károsodások megelőzése mellett, az intraluminális nyomás csökkenése esetén, az agyszövet hipoperfúzióját is el kell kerülnie [28].

1.1.2. A nyomás-indukálta myogén válasz celluláris mechanizmusai

Az elmúlt két évtizedben jelentős előrelépés történt az agyi artériák és arteriolák intraluminális nyomás által kiváltott myogén összehúzódásának hátterében álló sejtes és molekuláris mechanizmusok tisztázásában [29-33]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az agyi artériák falának simaizomsejtjei citokróm P-450 4A enzimet expresszálnak, ami az intraluminális nyomás növekedésének hatására erős érösszehúzó hatású arachidonsav metabolitot, 20-hydroxyeikozatetraén-savat (20-HETE) termel [13, 34, 35]. A nyomás-növekedés által indukált 20-HETE a cerebrovaszkuláris simaizom sejtekben protein kináz C aktiváláshoz, a Ca^{2+} -által aktivált K^+ csatornák gátlásához, L-típusú (feszültségfüggő) Ca^{2+} valamint tranziens receptor potenciál csatorna 6 (TRPC6) csatornák aktiválásához vezet, amelyek elősegítik a vaszkuláris simaizomsejtek depolarizációját, növelik az intracelluláris Ca^{2+} szintet és elősegítik a Ca^{2+} -indukált, aktin-myozin kapcsolaton alapuló érösszehúzódást [15]. A 20-HETE-szintézis [36] szerepén kívül meg kell említeni, hogy más útvonalak is hozzájárulnak a nyomás-indukálta simaizom depolarizációt követő érösszehúzódáshoz (egyéb "megnyúlás-aktivált" TRP-csatornák (TRPM4) [37], kloridcsatornák [38], integrinek és egyéb citoskeletális elemek [39, 40]). Fontos kiemelni, hogy a myogén válaszban az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt növelő mechanizmusokon túl a simaizom kontraktilis apparátusának Ca^{2+} -érzékenységet beállító (protein kináz C és Rho-A kináz függő) mechanizmusoknak is központi szerepe van [41-43].

I.2. A neurovaszkuláris kapcsolás és celluláris mechanizmusai: aktív agyi területek vérellátása

A neuronok energiafelhasználása (és ezáltal energiaigénye) magas, ugyanakkor az agyban nincsenek azonnal aktiválható energiaraktárak. Ennek megfelelően a neuronális aktivitás során szükség van a tápanyag- és oxigén szállítás gyors növelésére, valamint a mérgező anyagcsere-melléktermékek kimosására. Ennek a követelménynek a teljesítése érdekében a regionális CBF térben és időben pontosan szabályozott módon, szorosan kapcsolt különböző idegrendszeri funkciókat ellátó agyi területek neuronális aktivációjához [44, 45]. Ezt a funkcionális hiperémiát eredményező „feed forward” jellegű mechanizmust, amely fenntartja az optimális mikrokörnyezetet a normális idegi működéshez, neurovaszkuláris kapcsolásnak (neurovascular coupling, NVC) nevezzük [46]. A neurovaszkuláris kapcsolás a neuronok, astrocyták, az endothel sejtek és az agyi arteriolák simaizomsejtjeinek és a kapillárisok pericytáinak összehangolt egymásra hatása során jön létre [46]. Ezen celluláris komponensek összességét nevezzük neurovaszkuláris egységnek (neurovascular unit, NU). A neurovaszkuláris kapcsolás jelenlegi modelljei alapján több párhuzamos folyamat kölcsönhatása biztosítja, hogy a neuronális aktivitás lokális értágulathoz és a regionális CBF növekedéséhez vezet. A neuronális aktiváció során a neuronális nitrogén-monoxid-szintáz eredetű NO [47, 48] és/vagy a neuronális prosztaglandin felszabadulás [49] hozzájárulhat az

agyi arteriolák átmérőjének növekedéséhez mind közvetve, az astrocytákban történő mechanizmusok modulálásával, mind pedig közvetlenül az arteriola simaizomsejtekre hatva. Mivel az astrocyták a neuronok és a vaszkuláris sejtek között helyezkednek el, ideális helyzetben vannak ahhoz, hogy a neuronális aktivációt a területet ellátó erek vazomotor válaszához kapcsolják. Úgy tűnik, hogy az astrocyták aktiválásában központi szerepet játszik a szinapszisokból felszabaduló glutamát [50]. A glutamát aktiválja az astrocyták metabotróp glutamát-receptorait (mGluR) és NMDA-receptorait [51], amelyek az astrocytákban megnövekedett Ca^{2+} beáramláshoz és ezáltal ciklooxygenázok és epoxigenázok aktivációjához vezetnek. Az aktivált enzimek arachidonsavból dilatátor hatású prosztaglandinokat (PGE2) és epoxieikozatrién-sav származékokat (EET) készítenek. Ezek a mediátorok lokális vazodilatációt idéznek elő a vaszkuláris simaizomsejtek feszültségfüggő (BK) Ca^{2+} csatornáinak és TRPV4 csatornáinak aktiválásán keresztül [52, 53]. A fentiek mellett az astrocyta eredetű ATP is hozzájárul az agyi reaktív hiperémiához a vaszkuláris simaizomsejtek A2A purinerg receptorain keresztül, valamint az endotheliális P2Y1 receptorok aktiválásával, ami indukálja az endothelialis NO termelődését [54, 55] [51, 55, 56]. A neurovaszkuláris kapcsolatban a neuronális aktiváció során megnövekedő extracelluláris K^+ is központi szerepet játszhat [57, 58]: az astrocyták a neuronális aktivációt követően az extracelluláris K^+ -t felveszik és az arteriolák perivaszkuláris terében azt felszabadítják, ami hiperpolarizációhoz, a simaizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} csökkenéséhez és az agyi arteriolák dilatációjához vezet [57, 58].

Mint említettem, az aktív agyi területek megnövekedett energiaigényét a lokálisan illesztett véráramlás növekedés elégíti ki [59], ennek hiányában megbomlik az aktív agyterület metabolikus igénye és a tápanyag-oxigén ellátás közötti egyensúly [60]. A neurovaszkuláris kapcsolat károsodása ennek megfelelően minden bizonnyal az agyműködés funkcionális károsodásával jár. Ezt a koncepciót számos állatkísérletes és humán vizsgálat támogatja [61-64]. A neurovaszkuláris szét-kapcsolás idegrendszeri funkciókárosító hatásáról (elsősorban a kognitív funkcióban) a téziszűzet későbbi fejezetében részletesen, tudományos vizsgálat eredményeit ismertetve vissza fogok térni.

II. Célkitűzések

A jelen értekezésben összefoglalt tudományos munka vezérfonala az agyi vérkeringés szervezésében központi szerepet játszó folyamatok, az agyi autoreguláció, valamint neurovaszkuláris kapcsolat kóros megváltozásának, a diszfunkció celluláris kórfolyamatainak és következményeinek tisztázása volt epidemiológiai szempontból fontos kórképekben. Ennek megfelelően célkitűzéseink a következők voltak:

- Az agyi autoregulációs diszfunkció következményeinek és celluláris folyamatainak meghatározása hipertóniában, öregedésben és traumás agykárosodásban. A feltárt vaszkuláris kórfolyamatok interakciójának vizsgálata, a lehetséges farmakológiai kezelésnek alapot adó kísérletes terápiás beavatkozások tesztelése.

- A fenti kórképekben kialakuló direkt mikrovaszkuláris károsodás és következményeinek kimutatása.

- A károsodott neurovaszkuláris kapcsolat kognitív funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata, az öregedés-okozta neurovaszkuláris károsodás mechanizmusainak feltárása preklinikai modellekben, azt követően pedig, a kapott eredmények alapján emberben.

III. Az agyi véráramlás autoregulációjának károsodása különböző kórképekben: a konstriktor és dilatátor mechanizmusok egyensúlyának kóros megbomlása

III.1. Agyi autoregulációs diszfunkció hipertóniában és öregedésben: mechanizmus és következmények

Bevezetés

A magas vérnyomás káros hatással van az agyra és az agyi vérkeringésre. A nyugati világ lakossága öregszik, és mivel a magas vérnyomás a legtöbb idős embert (65 év felett) érinti, az idős populációban nagyobb valószínűséggel alakulnak ki cerebrovaszkuláris eltérések [65]. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy időseknél a magas vérnyomás okozta mikrovaszkuláris károsodás elősegíti a vaszkuláris etiológiájú kognitív hanyatlás (VCI) [66, 67] kialakulását, amely az Alzheimer-kór után a második leggyakoribb oka a demenciának. A magas vérnyomás nem csak gyakoribb idős életkorban, hanem annak káros cerebrovaszkuláris hatásai súlyosbodnak az idős betegeknél, míg a fiatal populáció védettebb a magas vérnyomás okozta cerebro-mikrovaszkuláris károsodásokkal szemben [68-70]. Másként fogalmazva, az előrehaladott életkor és a magas vérnyomás szinergikus hatást fejtenek ki a cerebrovaszkulátúra károsodásában és következményeinek kialakulásában. Mint azt korábban említettem, fiatal állatokon végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az agyi artériák funkcionális és szerkezeti adaptációt mutatnak a magas vérnyomással szemben, ami megvédi az agyi mikrocirkuláció disztális részét a nyomás- és volumen túlterheléstől, illetve annak random változásaitól [71, 72].

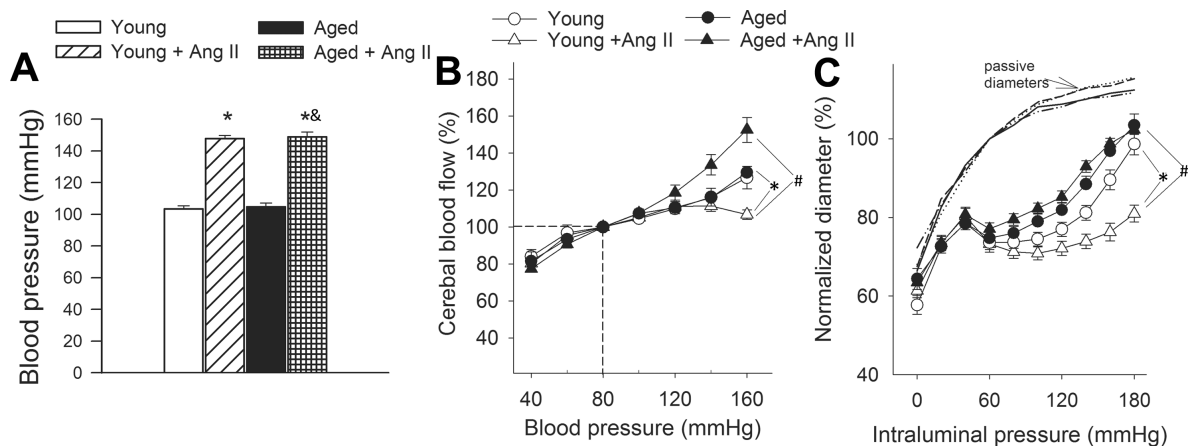
Hipotézis és módszer

A fentiek alapján felvetődött, hogy a fiatal életkorban látott adaptív mechanizmus károsodása lehet az, amin keresztül az öregedés fokozza a cerebro-mikrovaszkulátúra sérülékenységét hipertóniával szemben. Ezen feltevés tesztelésére krónikus magasvérnyomást indukáltunk angiotensin II krónikus adásával fiatal (3 hónap) és idős (24 hónap) C57BL/6 egerekben, majd felmértük a hipertónia és az öregedés hatását az agyi véráramlás autoregulációjára (*in vivo*) valamint izolált agyi erek myogén válaszára (*ex vivo*). Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az agyi autoregulációs diszfunkció lehetséges károsodása miként hat a disztális érszakasz épségére: a vér-agy gát funkcióra és mikrovaszkuláris denzitásra (kapilláris sűrűség), valamint ezeken keresztül a neuronális károsodást jelző neuroinflammációra, valamint kognitív funkcióra.

Eredmények

A CBF autoregulációjának károsodása idős hipertóniás egerekben

Fiatal, normotenziós, kontroll egerekben a CBF független volt a vérnyomástól a 60-120 Hgmm közötti vérnyomás tartományban, ami arra utal, hogy az autoregulációs funkció megfelelően működött. Fiatal és idős normotenzív egerek között nem figyeltünk meg különbséget az autoregulációs funkcióban. Fiatal hipertóniás egerekben az autoregulált nyomástartomány magas értékek felé mozdult el, jelezve a bevezetőben említett adaptív vaszkuláris reakciót. Idős, hipertóniás egerekben a vérnyomás és a CBF közötti kapcsolat lényegében lineáris volt, ami a CBF teljes vérnyomástól való függését és az autoreguláció elvesztését jelzi (1. ábra).



1. ábra. Az öregedés károsítja a cerebrovaszkuláris autoreguláció adaptációját magas vérnyomáshoz. (A) Angiotensin II (AngII) krónikus adásának hatása fiatal (Young, 3 hónap) és idős (Aged, 24 hónap) egerekben. (n=20-25 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Young; & $p < 0,05$ vs. Aged). **(B)** Az agyi véráramlás (CBF) és a szisztolés vérnyomás közötti kapcsolat fiatal kontroll, fiatal hipertóniás (Young+AngII), idős kontroll és idős hipertóniás (Aged+AngII) egerekben (n=8). Fiatal kontroll egerekben a CBF statisztikailag eltér a 100 Hgmm értéktől <60 és >140 Hgmm nyomásértékeknél mértől, ami az autoregulációs tartományt jelzi. Fiatal hipertóniás egerekben az autoregulált tartomány nagy nyomásértékek felé eltolódott, ami jelzi az adaptív válaszreakciót (* $p < 0,05$ vs. Young). Ez az adaptáció teljesen hiányzott az idős hipertóniás egerekben (# $p < 0,05$ vs. Young+AngII). **(C)** Az egyes kísérleti csoportokból izolált arteria cerebri media (MCA-k) átmérőjének változásai az intraluminális nyomás függvényében (myogén válasz). Az érátmérők az adott erek passzív átmérőjének százalékában vannak kifejezve 80 Hgmm-nél (* $p < 0,05$ vs. Young, # $p < 0,05$ vs. Young+AngII).

Csökkent Ca^{2+} függő, nyomás-indukálta myogén konstriktió idős hipertóniás egerek izolált agyi ereiben

A fiatal hipertóniás egerekből származó MCA-k myogén összehúzódása szignifikánsan fokozódott a normotenzív kontrollokhoz képest, és a myogén tónus közel azonos szinten maradt ~160 Hgmm-ig, ami megfelel a CBF megnövekedett autoregulációs tartományának ezekben az állatokban. A myogén konstriktióval párhuzamosan fiatal hipertóniás egerek agyi ereinek simaizom intravaszkuláris Ca^{2+} koncentrációja (SMC $[Ca^{2+}]_i$) is szignifikánsan növekedett magas nyomásértékek hatására. Idős egerek MCA-iban az erek nem mutattak hasonló, magas vérnyomás által kiváltott adaptív növekedést sem az SMC $[Ca^{2+}]_i$ -ben, sem a myogén összehúzódásban.

A 20-HETE és a TRPC6 szerepe idős hipertóniás egerek agyi ereinek magasvérnyomással szemben mutatott károsodott adaptációjában

Fiatal hipertóniás egerek MCA-jában a nagy nyomás-által indukált megnövekedett myogén tónus fokozott kifejlődését és a simaizom sejtek nyomás-indukálta fokozott intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját mind a 20-HETE termelődés specifikus inhibitora (HET0016), mind a TRPC6 csatorna gátlószere (SKF96365) szignifikánsan megakadályozta, ugyan akkor sem a HET0016, sem az SKF96365 nem befolyásolta szignifikánsan a myogén tónust és SMC $[Ca^{2+}]_i$ -t idős hipertóniás egerek agyi ereiben. A 20-HETE által okozott vazokonstriktió gátolható volt TRPC6-inhibitor SKF96365, azt sugallva, hogy a nyomás-indukálta termelődést követően a 20-HETE a TRPC6 csatorna aktiválásán keresztül okoz fokozott SMC $[Ca^{2+}]_i$ -ot valamint vazokonstriktiót fiatal hipertóniás egerek agyi ereiben, és ez a mechanizmus hiányzik idős hipertóniás egerekben. Ezt a feltevést támogatja, hogy a

hipertónia a 20-HETE termelését végző CYP 4A arachidonsav ω -hidroxiláz Cyp4a12, Cyp4a10 és Cyp4a14 valamint a TRPC6 csatornák fokozott expresszióját okozta fiatal egerek MCA-iban, míg ezek az adaptív válaszok szignifikánsan károsodottak voltak vagy hiányoztak idős hipertóniás egerek MCA-iban.

Az öregedés fokozza a hipertónia által indukált vér-agy gát zavart

Azt találtuk, hogy az öregedés súlyosbítja a hipertónia által kiváltott nátrium-fluoreszcein extravazációt a hippocampusban, cortikálisan és a fehérállományban is. A hipertónia és öregedés vér-agy gát zavart okozó szinergikus hatását tovább támogatták eredményeink, amelyek szerint a plazmából származó IgG immunfestése jelentős perivaszkuláris IgG-lerakódásokat mutatott ki idős, magas vérnyomású egerek hippocampusában. A fiatal hipertóniás egerek hippocampusában az IgG extravazáció jelentősen csökkent, és nem volt kimutatható fiatal kontroll egerekben. Az idős hipertóniás egerek strukturális vér-agy gát károsodására utal, hogy ezen állatok hippocampalis mintáiban a vér-agy gát tight-junction fehérjeinek (ZO-1, occludin, claudin 5) csökkent expresszióját találtuk.

Az öregedés fokozza a hipertónia által indukált pericyta pusztulást és kapilláris sűrűség csökkenést

Felmérve a hippocampalis mikroerek pericyta-borításának életkor és magas vérnyomás okozta változásait azt találtuk, hogy fiatal egerekben a hipertónia a pericyták relatív számának és a kapillárisok pericyta-lefedettségének jelentős csökkenését (~29%-kal) eredményezte. Idős egerekben a hipertónia által kiváltott csökkenés a pericyták számában és a pericyta lefedettségben szignifikánsan súlyosbodott (~41%-kal). A magas vérnyomás által kiváltott kapilláris-sűrűség csökkenés az idős hipertóniás egerek hippocampális CA1, CA3 és DG (gyrus dentatus) régióiban, valamint retrosplenialis területein, primer szomatoszenzoros kérgében és corpus callosumában szignifikánsan nagyobb volt, mint fiatal egerekben.

Az öregedés fokozza a hipertónia által indukált hippocampális neuroinflammációt és oxidatív stresszt

Eredményeink szerint maga az öregedés a hippocampusban lévő aktivált microglia számának relatív növekedésével járt, ami a magas vérnyomás hatására szignifikánsan növekedett. A microglia aktiváció számos pro-inflammatorikus citokin és kemokin fokozott expressziójával járt együtt az idős hipertóniás egerek hippocampusában. Az oxidatív/nitrozatív stressz jelenlétét vizsgálva azt találtuk, hogy a hippocampális 3-nitrotirozin szintje megnőtt fiatal, magas vérnyomású egerekben, amit az öregedés szignifikánsan fokozott.

Az öregedés fokozza a hipertónia által indukált kognitív funkció romlást

Módosított „elevated plus maze-learning protocol”-t használva azt találtuk, hogy a fiatal kontroll egereknél a transzfer latencia a 2. napon szignifikánsan csökkent az 1. naphoz képest, ami intakt tanulási folyamatot jelez (tanulási index: 1). A fiatal hipertóniás egerek (~0,7) és idős (~0,67) egerek tanulási indexei csökkentek a fiatal kontroll egerekhez képest, a különbségek nem értek el statisztikai szignifikanciát. Idős hipertóniás egerek esetében a transzfer latencia hasonló volt az 1. és 2. napon (ez ~0 tanulási indexnek felel meg), jelezve, hogy ezeknek az egereknek a hippocampus-függő kognitív funkciója szignifikánsan károsodott.

Megbeszélés

Az agyi vérkeringésben a pialis artériák és arteriolák jelentős szerepet játszanak a cerebrovaszkuláris rezisztenciában, a Willis-kör fő ereinek disztális szegmentumainak myogén összehúzódása egyedülállóan fontos az agyi mikrocirkuláció védelmében [73]. Egészséges fiatal állatokban a nyomás-növekedés által kiváltott myogén konstriktió kritikus homeosztatikus mechanizmusként működik, amely biztosítja, hogy a megnövekedett artériás nyomás ne propagáljon a mikrocirkuláció disztális részébe [74, 75]. Hipertóniás fiatal egerekben és patkányokban [76, 77] az agyi artériák myogén konstriktiója fokozódik, ezáltal az agyi autoregulációs tartomány jobbra, nagyobb nyomásértékek felé tolódik. Másként fogalmazva, ezen erek (és általuk az autoregulációs funkció) alkalmazkodnak a magasabb szisztémás vérnyomáshoz, védve az agyi mikrocirkulációt [71, 72, 74-76]. A fent részletezett vizsgálatok voltak az elsők, amelyek bemutatták, hogy idős egerek agyi artériái nem mutatnak magas vérnyomás által kiváltott adaptív myogén összehúzódást. Fiatal állatokban egy 20-HETE/TRPC6-függő útvonal aktivációja vezet az agyi artériák funkcionális adaptációjához magas vérnyomás esetén, és ez az adaptív válasz az öreg állatokban hiányzik. Idős állatokban a magas vérnyomás által indukált 20-HETE termelő cerebrovaszkuláris enzim expresszió (Cyp4A12, CypA10 és CypA14) csökkent. Szintén, míg fiatal egerek agyi artériáiban a magas vérnyomás fokozza a TRPC6 expresszióját és a TRPC6-függő nyomás-indukálta SMC Ca^{2+} koncentrációt és a myogén konstriktiót, addig ez az adaptív válasz károsodott az idős hipertóniás egerekben. Mint azt már többször említettem, idős hipertóniás állatokban a megfelelő autoregulációs védelem hiánya valószínűleg lehetővé teszi, hogy a magas vérnyomás elérje az agyi mikrocirkulációt, ami ezáltal BBB-károsodáshoz vezet.

Idős, magas vérnyomású egerekben a sérült BBB-n keresztül a plazma összetevői bejuthatnak az agyszövetbe. Ennek köszönhetően többféle mechanizmussal befolyásolhatják az idegsejtek működését [78, 79]. Ezek közül a legjelentősebbnek az extravazált plazma összetevők által okozott neuroinflammáció tűnik. Ezzel összhangban eredményeink szerint idős hipertóniás egerekben a BBB károsodása és az IgG fokozott extravazációja a microglia sejtek fokozott hippocampális megjelenésével jár. Ezzel párhuzamosan idős hipertóniás egerek hippocampusában fokozott a microglia-eredetű gyulladáshoz vezető mediátorok jelenléte és expressziója. Ezekről a citokinekről, kemokinekről és reaktív oxigén gyökökről kimutatták, hogy neuronális diszfunkcióhoz vezetnek [80, 81]. A fent említett vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy végeredményben a fokozott neuroinflammációs reakció összefüggésben áll a hipertónia által kiváltott hippocampus-függő kognitív funkció károsodásával idős egerekben.

Összefoglalás

A fent részletezett vizsgálatok legfontosabb eredményeit röviden összefoglalva elmondhatjuk, hogy az öregedő agyi artériák myogén konstriktiója nem mutat adaptív növekedést magas vérnyomással szemben, ami a 20-HETE/TRPC6 útvonal korfüggő diszregulációjának köszönhető. A következményes autoregulációs diszfunkció idős hipertóniás állatokban a magasvérnyomás okozta BBB-zavar súlyosbodásával, neuroinflammációval és kognitív hanyatlással jár.

III.2. Agyi erek myogén autoregulációs működésének károsodása súlyos koponya-agy sérülés után

Bevezetés

A traumás agysérülés (TBI) a vezető halálozási okok egyike (40 év alatt az első), és a hosszú távú rokkantság egyik fő okozója [82]. A TBI körülbelül 1,7 millió embert érint évente az Egyesült Államokban [82-84] és 2,5 millió beteget az Európai Unióban [84], a halálozási arány 35–40%. Az Egyesült Államokban körülbelül 5,3 millió ember él TBI-vel összefüggő fogyatékkal [83], az EU-ban pedig 7,7 millió ember [84]. A sérülés pillanatában a fejre ható fokális erő, illetve a koponyán belüli hirtelen gyorsulás/lassulás elsődleges károsodást okoz az agyban. Ezt követően, a primer károsodás által elindított, több, párhuzamosan kialakuló kóros folyamaton keresztül az agyszövet másodlagos károsodása jön létre.

Egyre több kísérleti és klinikai bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a TBI rontja az agyi véráramlás autoregulációját [85-97], aminek központi szerepe van a másodlagos agykárosodás kialakulásában. A jelenség nyilvánvaló kórtani jelentősége ellenére [85-88, 98, 99] az agyi artériák súlyos TBI-t követő myogén autoregulációs diszfunkciójának hátterében álló sejtes és molekuláris mechanizmusok nem voltak ismertek.

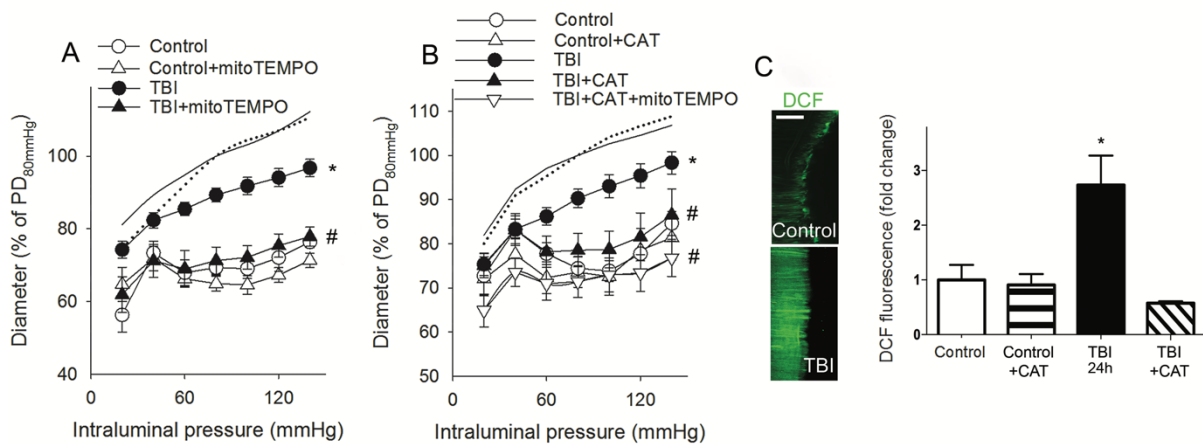
Hipotézis és módszer

Irodalmi adatok és saját megelőző kísérletes eredményeink alapján feltettük, hogy a TBI-indukálta mitokondriális oxidatív stressz, valamint az abból származó erőteljes agyi vazodilatátor, a H_2O_2 felelős az agyi erek csökkent myogén konstriktójáért. A H_2O_2 tranziens receptor potenciál vanilloid csatorna 4 (TRPV4)-függő úton aktiválni képes a myogén választ negatív visszacsatolással szabályozó membrán csatornát, a kalcium-függő kálium csatornát (BK_{Ca}) [100-103][104-106]. Ezért szintén feltételeztük, hogy a TBI-okozta mitokondriális H_2O_2 ezen az útvonalon károsítja az agyi erek myogén konstriktóját. Hipotéziseink teszteléséhez súlyos diffúz koponya traumát idéztünk elő patkányokban, majd megvizsgáltuk az állatokból izolált arteria cerebri media-k (MCA) H_2O_2 termelését, valamint nyomás-indukálta myogén válaszait mitokondriális szabadgyök fogók jelenlétében. Ezt követően meghatároztuk a TRPV4 és BK_{Ca} csatornák specifikus blokkolóinak hatását az agyi artériák TBI által kiváltott myogén autoregulációs diszfunkciójára, meghatároztuk e csatornák szerepét az exogén H_2O_2 által kiváltott vazomotoros válaszokban, valamint patch clamp segítségével jellemeztük cerebrovaszkuláris simaizom sejteken a H_2O_2 valamint TRPV4 inhibitorok hatását a BK_{Ca} ion áramokra.

Eredmények

A mitokondriális H_2O_2 szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után

Azt találtuk, hogy a patkányokból 24 órával a súlyos TBI után izolált MCA-k myogén összehúzódásai szignifikánsan csökkentek a kontroll MCA-hoz képest az autoreguláció nyomástartományában (60-140 Hgmm között). A mitokondriális antioxidáns mitoTEMPO visszaállította a TBI után csökkent myogén konstriktót a kontroll MCA-k szintjére, ami arra utal, hogy a mitokondriumokból származó ROS kulcsszerepet játszik a TBI által kiváltott myogén diszfunkcióban. Eredményeink, amelyek szerint a kataláz (CAT- H_2O_2 bomlását katalizáló antioxidáns) szintén helyreállította a TBI után látott csökkent myogén választ, valamint a mitoTEMPO további hozzá adása nem járt addicionális hatással, arra utalnak, hogy a mitokondriumból származó H_2O_2 az elsődleges faktor, amely csökkenti az agyi erek myogén összehúzódását TBI után. Ezt támasztották alá további megfigyeléseink, miszerint a TBI szignifikánsan fokozta a cerebrovaszkuláris H_2O_2 termelést, ami szelektíven gátolható volt kataláz jelenlétében (2. ábra).



2. ábra. A TBI károsítja az agyi artériák myogén összehúzódását: a mitokondriális H₂O₂ szerepe.

A: izolált arteria cerebri media-k (MCA) myogén válaszai (a nyomás-indukálta átmérőválasz a 80 Hgmm-es passzív átmérő (PD) százalékában van kifejezve) kontroll és TBI patkányokban mitokondriális antioxidáns mitoTEMPO (n=5 minden csoportban, *p<0,05 vs. kontroll; #p<0,05 vs. TBI) és kataláz (CAT) jelenlétében **(B)**. A mitoTEMPO érkamrába adása nem növeli a CAT hatását az átmérő válaszokra (n=5, *p<0,05 vs. kontroll; #p<0,05 vs. TBI). **C:** Cerebrovaszkuláris H₂O₂-termelés (reprezentatív képek és összegzett adatok) kontroll patkányok, TBI-patkányok, valamint kontroll- és TBI-patkányok endothélium-mentes MCA-iban az erek katalázban (CAT) történő inkubálása után. A H₂O₂ termelést a sejtpermeábilis oxidatív fluoreszcens indikátor festék DCF fluoreszcenciája mutatja. (skála: 50 μm, n=5 csoportonként, *p<0,05 vs. Kontroll).

A BK_{Ca} csatorna szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után

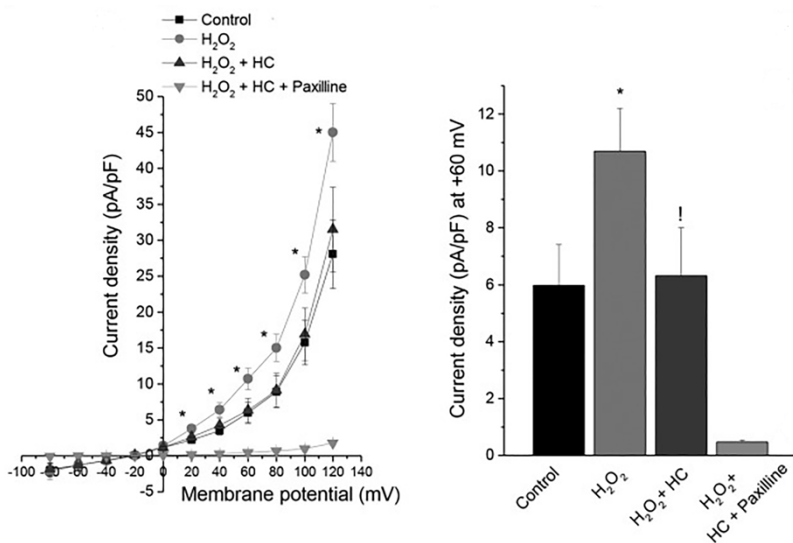
A BK_{Ca} csatornák specifikus gátlása paxillinnel izolált MCA-kon a TBI utáni gyengült myogén konstriktiót a kontroll szintre állította vissza. Ezen túlmenően azt találtuk, hogy a TBI-n átesett patkányok MCA-iban a H₂O₂ szignifikánsan nagyobb dilatációt váltott ki, mint a kontroll állatok MCA-iban, valamint a dilatátor érválaszt gátolta a BK_{Ca} csatorna blokkoló paxillin. Emellett azt találtuk, hogy a TBI fokozza a BK_{Ca} csatornák cerebrovaszkuláris mRNS expresszióját, ami valószínűleg megmagyarázza a csatornák fokozott tágító hatását TBI után.

A TRPV4 szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után

Izolált agyi erek TBI után csökkent myogén válasza visszaáll a kontroll szintre a HC067047, a TRPV4 csatornák specifikus blokkolója jelenlétében. Az MCA-k H₂O₂ által kiváltott dilatációja csökkent HC067047 jelenlétében, arra utalva, hogy a H₂O₂ által kiváltott dilatációt a TRPV4 csatorna mediálja. A TRPV4 agonista GSK1016790A-indukálta vazodilatáció szignifikánsan nagyobb volt TBI után, mint kontroll állatok agyi ereiben, valamint azt a specifikus BK_{Ca} csatorna blokkoló paxillin gátolta. A TBI szignifikánsan fokozta a TRPV4 gén cerebrovaszkuláris mRNS expresszióját, ami valószínűleg megmagyarázza a TRPV4 agonista által indukált fokozott dilatátor érválaszt koponya trauma után.

H₂O₂ a TRPV4 csatornán keresztül aktiválja a BK_{Ca} csatornát izolált cerebrovaszkuláris simaizom sejten

WKY Patkányok MCA-iból izolált vaszkuláris simaizomsejteken (VSMC) mértük a BK_{Ca} csatorna áramot patch clamp módszerrel. Izolált MCA-kon végzett eredményeinket alátámasztva azt találtuk, hogy a H₂O₂ a VSMC-eken szignifikánsan növelte a BK_{Ca} áramot, amit a TRPV4 csatornák gátlása megszüntetett (3. ábra).



3. ábra. A H₂O₂ TRPV4 csatornán keresztül vezet a kalcium-aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornák aktivációjához.

Izolált cerebrovaszkuláris simaizom sejtek teljes sejt BK_{Ca} áramait vizsgáltuk H₂O₂ hozzáadására, valamint TRPV4 csatorna inhibitor (1 μM HC067047, mint HC jelölve) és BK_{Ca} csatorna inhibitor (paxillin 100 nM) jelenlétében és hiányában (8-12 sejt/csoport). Az ábrán az áram-feszültség görbék és az áramsűrűség értékek láthatók (+60 mV membránpotenciál mellett). **p* < 0,05 H₂O₂ alkalmazása előtt és után; !*p* < 0,05 1 μM HC 067047 adása előtt és után H₂O₂ jelenlétében.

Megbeszélés

A fenti eredmények elsőként demonstrálták, hogy súlyos TBI után a vaszkuláris simaizom sejtekben történő mitokondriális szabadgyök termelődés [107, 108] központi szerepet játszik az agyi artériák károsodott myogén összehúzódásában. A TBI-által indukált mitokondriális oxidatív stresszhez vezető folyamatok nem tisztázottak, de szerepe lehet mechanoszenzitív mtROS termelésnek [109, 110], a sérült agyi parenchymából felszabaduló tényezőknek (beleértve a glutamát neurotoxicitást) [111-113] és/vagy humorális tényezőknek [114, 115]. A mitokondriális szabadgyök termelődésben az elektrontranszport lánc I. és III. komplexe kiemelt szerepet játszik [116, 117]. A mitokondriális szuperoxidot a vaszkuláris simaizom sejtekben is expresszálódó mangánáz szuperoxid-dizmutáz (MnSOD) alakítja H₂O₂-vé [107, 118-121]. A H₂O₂-ra a mitokondriális membránok jelentős permeabilitást mutatnak, azokon áthaladva a termelődést követően a simaizom sejtek citoszoljában a H₂O₂ szintje megemelkedik [100]. Eredményeink, melyek szerint H₂O₂-t bontó kataláz helyreállítja a TBI-s patkányokból származó MCA-k myogén válaszait, kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozólag, hogy a mitokondriumokból származó megnövekedett H₂O₂ szint kulcsszerepet játszik a diffúz agyi trauma utáni artériás myogén összehúzódás diszregulációjában.

Kimutattuk, hogy a BK_{Ca} csatornák szelektív blokkolása helyreállította a TBI-s patkányokból származó MCA-k károsodott myogén konstriktióját, valamint a BK_{Ca} csatorna blokkoló paxillin jelenlétében a H₂O₂ nem váltott ki vazodilatációt. Szintén, a H₂O₂ szignifikánsan megnövelte a BK_{Ca} csatorna aktivitását vaszkuláris simaizomsejteken. Mindezek azt sugallják, hogy TBI után a mitokondriumokból származó H₂O₂ a BK_{Ca} csatornák aktivációján keresztül csökkenti az agyi erek myogén konstriktióját.

A vanilloid családba tartozó 4-es típusú tranziens receptor csatornák (TRPV4) mechanoszenzitív, nem szelektív kationcsatornák, amelyek fontos szerepet játszanak a cerebrális vazomotor tónus fenntartásában [104] és a simaizom sejtekben detektált, BK_{Ca} csatornák szabályozó Ca²⁺ spark-ok kialakulásában is [122]. Ezen összefüggések kórtani jelentőségét tárták fel eredményeink, melyek szerint a TRPV4 csatornák szelektív blokkolása gátolja a H₂O₂ által kiváltott vazodilatációt, és helyreállítja a TBI-s patkányokból izolált agyi artériák myogén válaszait. Továbbá, az agyi artériák TRPV4 agonista által kiváltott vazodilatációját a BK_{Ca}-csatorna blokkoló megszünteti. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a TBI után fokozottan termelt mitokondriális H₂O₂ a BK_{Ca}-csatornák TRPV4 csatornákon keresztül aktiválja. Ennek az elképzelésnek közvetlen kísérleti bizonyítékát adják

eredményeink, amelyek szerint izolált cerebrovaszkuláris simaizom sejteken a H₂O₂ által kiváltott BK_{Ca} áramot a TRPV4-blokkoló HC067047 gátolja.

Összefoglalás

Kimutattuk, hogy súlyos diffúz koponya-agy sérülést követően patkányban fokozott cerebrovaszkuláris mitokondriális H₂O₂ termelés alakul ki, ami vanilloid típusú tranziens receptor csatornák (TRPV4)-on keresztül aktiválja a vaszkuláris simaizom sejtek Ca²⁺-aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornáit, és ezáltal megakadályozza a nyomás-növekedés által indukált myogén vaszkuláris konstriktió kialakulását. Feltehető, hogy ez a mechanizmus hozzájárulhat a TBI-s betegek (általunk is megfigyelt) autoregulációs diszfunkciójához, és az útvonal célzott farmakológiai befolyásolása az agyi véráramlás autoregulációjának helyreállításán keresztül csökkentheti a másodlagos agysérülést.

III.3. Az enyhe koponya-agy sérülés fokozza a hipertónia által-indukált cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stresszt – a TBI-indukálta szabadgyök képződés hatékony csökkentése

Bevezetés

Epidemiológiai felmérések kimutatták, hogy meglévő társbetegségek súlyosbítják a traumás agykárosodás (TBI) káros hatásait: hosszabb intenzív osztályos kezelést eredményeznek, valamint megnövelik a szövődmények és az újbóli kórházi kezelések kockázatát [123]. A TBI-ben leggyakrabban azonosított komorbid állapot a hipertónia [124, 125], aminek jelentőségét aláhúzza, hogy kísérleti állatokban a magasvérnyomás fokozta a TBI-t követő mortalitást [126].

Amint az fent kimutattuk, a TBI-által okozott cerebrovaszkuláris diszfunkcióban, és minden bizonnyal a másodlagos agykárosodásban, központi szerepet játszik a cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz [85] [127]. A leggyakoribb TBI típus, az enyhe koponya trauma (mild-mTBI) után ugyan a szabadgyökök termelésének csak átmeneti növekedését mutatták ki [128], ennek szerepe lehet hosszú távú cerebrovaszkuláris és neuronális eltérésekben. A magas vérnyomásról ismert, hogy önmagában illetve más kórállapotokkal szinergizálva, fokozza a cerebrovaszkuláris oxidatív stresszt [129], például az öregedés által kiváltott mitokondriális oxidatív stresszt egerek agyi artériáiban [130].

Hipotézis és módszer

Feltettük, hogy a már meglévő artériás magas vérnyomás súlyosbítja az mTBI által kiváltott cerebrovaszkuláris oxidatív stresszt azáltal, hogy fokozza a TBI által kiváltott mitokondriális ROS (mtROS) termelést. Szintén feltételeztük, hogy a TBI-indukálta oxidatív stresszben a NADPH-oxidáz is szerepet játszik. Végül, célunk volt a megnövekedett cerebrovaszkuláris oxidatív stressz hatékony csökkentése. Hipotéziseink tesztelése céljából enyhe TBI-t indukáltunk normotenzív Wistar és spontán hipertóniás (SHR) patkányokban. A celluláris oxidatív stresszt arteria cerebri media (MCA) izolált szegmenseiben vizsgáltuk dihidroetidium (DHE) fluoreszcens festékkel. Az mtROS termelést a mitokondrium-specifikus redox-érzékeny fluoreszcens MitoSox segítségével értékeltük. A mitokondriális oxidatív stressz csökkentésére a belső mitokondriális membránon belül a citoszollal összehasonlítva 1000-szeres koncentrációt elérő antioxidáns Szeto-Schiller (SS)-31 peptidet használtunk [131].

Eredmények

Egyszeri, enyhe koponya trauma tartós mitokondriális oxidatív stresszt indukál hipertóniás patkányok agyi artériáiban

Az SHR-ek vérnyomása szignifikánsan magasabb volt, mint a normotenzív patkányoknak (Wistar: 109 ± 3 Hgmm, SHR: 183 ± 3 Hgmm), amire sem az enyhe traumás agysérülés, sem az SS-31 kezelés nem volt hatással. Két héttel az mTBI után a hipertóniás patkányok agyi ereinek simaizom és endothel rétegében egyaránt fokozott DHE festődés oxidatív stressz jelenlétére utalt, amit a TBI után megkezdett SS-31 kezelés szignifikánsan csökkentett. Célzottan a mitokondriális szabadgyök termelődést vizsgálva azt találtuk, hogy a DHE-vel párhuzamosan a MitoSox fluoreszcencia szignifikánsan megnövekedett mind az endothel, mind a simaizomsejtekben SHR-ekből származó MCA-kban, míg a normotenzív patkányok MCA-iban nem volt szignifikáns változás. SHR-ekben a TBI után megkezdett SS-31 kezelés szignifikánsan csökkentette a MitoSox fluoreszcenciáját az endothelben és a simaizomsejtekben egyaránt.

A NADPH-oxidáz szerepe az enyhe koponya trauma által kiváltott fokozott mitokondriális oxidatív stresszben hipertóniás patkányok agyi artériáiban

A spontán hipertóniás patkányok izolált agyi artériáinak simaizom- és endotheliális rétegeiben a DHE és MitoSox fluoreszcenciával jelzett, enyhe TBI által kiváltott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szignifikánsan csökkent a NADPH-oxidáz inhibitor apocinin jelenlétében. A NADPH-oxidáz *Nox4* alegységének mRNS expressziója szignifikánsan fokozódott az SHR-ek MCA-jában mTBI után, amit az SS-31 kezelés meggátolt. Mindez a NADPH-oxidáz központi szerepét mutatja enyhe TBI-indukálta perzisztens mitokondriális oxidatív stressz kialakulásában hipertóniás patkányok agyi artériáiban.

Megbeszélés

A fent bemutatott egyik legfontosabb eredményünk, hogy meglévő komorbid hipertónia jelenlétében egyetlen enyhe traumás agysérülés elegendő, hogy tartós oxidatív stresszt idézzon elő az agyi artériáiban. Az mTBI által kiváltott perzisztáló cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz funkcionális következményei valószínűleg sokrétűek. Amint kimutattuk, a fokozott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz autoregulációs diszfunkcióhoz vezethet, ezen kívül az NO és a prosztanoid termelés és/vagy hasznosulás megváltoztatásával ronthatja az endothel funkciót [132], csökkentheti az agyi bazális véráramlást [133] és elősegítheti a neurovaszkuláris szét-kapcsolást [134]; ezek mindegyike hozzá járulhat kognitív diszfunkció kialakulásához. Eredményeinknek kiemelt transzlációs relevanciája van: az mTBI valószínűleg károsabb következményekkel jár hipertóniás betegekben, mint normotenzív emberekben. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a ROS-függő jelátviteli utakat célzó kezelések megelőzik és/vagy visszafordítják-e a CBF diszregulációját és a neuronális funkció romlását TBI-n átesett, hipertóniás és egyéb komorbiditásban szenvedő emberekben.

Eredményeink azt mutatják, hogy a NADPH-oxidáz aktiválása részt vesz a perzisztáló cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz kialakulásában. A mitokondriális membránhoz kapcsolt *Nox4* alegység mechanikai erők hatására aktiválható [135], aktiválódása pedig mitokondriális oxidatív stresszt indukál [136]. Ezen mechanizmus jelentőségét mutatják azon eredmények, melyek szerint a *Nox4* deléciója [137] és a NADPH-oxidáz inhibitor apocinin [138, 139] csökkenti a TBI utáni másodlagos sérülés súlyosságát. Az egymást kölcsönösen erősítő mitokondriális és NADPH-oxidáz eredetű ROS termelést támasztják alá a mi eredményeink is, miszerint a *Nox4* cerebrovascularis expressziója tartósan megnövekszik

az SHR-ekben mTBI után, amit a mitokondriális oxidatív stressz célzott gátlása SS-31-gyel visszafordít.

Végül, de nem utolsó sorban bemutattuk, hogy SS-31 kezeléssel (ami átlép a vér-agy gáton) hipertónia és mTBI által fokozott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz eredményesen csökkenthető. Ennek kiemelt jelentősége van a téziszüzetben korábban, valamint későbbi fejezetekben bemutatott eredményeink tükrében, melyek szerint a megnövekedett ROS ok-okozati összefüggésben áll agyi arteriolák endothel-függő dilatációjának károsodásával és az agyi funkcionális hiperémia csökkenésével [131] idős korban, valamint agyi erek autoregulációs diszfunkciójával traumás agysérülés után.

Összefoglalás

Kimutattuk, hogy komorbid hipertónia jelenlétében egyetlen enyhe traumás agysérülés elegendő, hogy tartós, mitokondriális és NADPH oxidáz-eredetű oxidatív stresszt idézzen elő az agy artériáiban. Szintén demonstráltuk, hogy a tartósan fennálló oxidatív stressz megelőzhető SS-31 peptiddel történő kezeléssel, ezzel egy preklinikai modellt létrehozva a TBI-asszociált cerebrovaszkuláris oxidatív stressz hatékony csökkentésére, és káros következményeinek megelőzésére.

III.4. Az intraluminális nyomás által indukált cerebrovaszkuláris konstriktor és dilatátor útvonalak közötti interakció: agyi erek autoregulációs működése súlyos koponya trauma után egyidejű magasvérnyomás betegség jelenlétében

Bevezetés

Az agyi erek myogén autoregulációs funkciójának eltéréseit bemutató fejezetekben tárgyaltam, hogy a krónikus magas vérnyomás a 20-HETE/TRPC6 útvonal fokozott aktivitásán keresztül az agyi artériák fokozott nyomás-indukálta myogén konstriktációját idézi elő, ami az agyi véráramlás autoregulációjának hipertóniában megfigyelt „jobbra” tolódásában fontos szerepet játszhat. Szintén bemutattuk, hogy súlyos traumás agysérülést követően a cerebrovaszkuláris Ca^{2+} -függő kálium (BK_{Ca}) csatorna-TRPV4-csatorna dilatátor útvonal aktiválódása az agyi rezisztencia erek nyomás-indukálta konstriktációjának csökkenéséhez vezet. Nem volt ismert azonban, hogy a 20-HETE-függő konstriktor és a BK_{Ca} -függő dilatátor útvonalak miként hatnak egymásra. A kérdés kórélettani jelentősége mellett a válasz klinikai jelentőségét a korábban említett tény adja, miszerint a TBI-n átesett betegek leggyakoribb cerebrovaszkuláris rizikó faktora a magas vérnyomás [140, 141], ami a TBI-indukálta másodlagos agysérülés exacerbációját okozhatja és a TBI fokozott mortalitásával jár [142-144].

Hipotézis és módszer

A nyomás-indukálta kóros konstriktor és dilatátor cerebrovaszkuláris útvonalak interakciójának vizsgálata céljából krónikus magasvérnyomásos patkányokban súlyos koponya traumát idéztünk elő, majd izolált agyi artériáik myogén válaszait összehasonlítottuk normotenzív, valamint traumát el nem szenvedett állatok agyi érválaszaival. Feltettük, hogy a hipertónia által fokozott, 20-HETE függő útvonal gátolja a BK_{Ca} -mediálta dilatátor útvonalat.

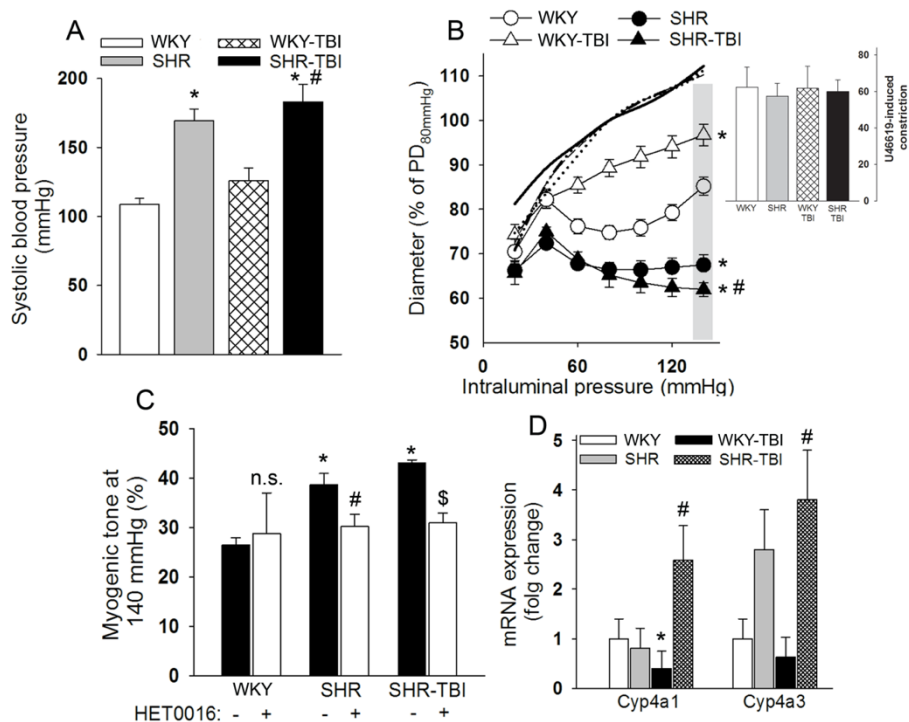
Eredmények

A hipertónia által indukált fokozott myogén vazokonstriktió agyi artériákban nem változik súlyos traumás agykárosodás után

A spontán hipertóniás patkányok-ban (SHR) (traumás agysérüléssel (TBI) és anélkül is) szignifikánsan magasabb szisztolés vérnyomásértékeket mértünk, mint a kontroll állatokban (WKY). A hipertóniás patkányok artéria cerebri media (MCA) izolált szegmentumainak myogén konstriktiója fokozódott a normotenzív WKY-hez képest, a nyomás-átmérő görbét nagyobb intraluminális nyomásértékek felé tolva. Míg traumás agysérülés szignifikánsan csökkentette a normotenzív WKY patkányok MCA-inak myogén válaszát, az MCA szegmentek myogén válaszai hipertóniás patkányokban TBI után fokozottak maradtak (nem különböztek a kontroll, traumán át nem esett SHR-ekből származó MCA-k myogén összehúzódásaitól). Az MCA-k konstriktor válaszai U46619 tromboxán A2 agonistával szemben nem különböztek szignifikánsan a csoportok között (4. ábra).

A 20-HETE szerepe a hipertónia-indukálta fokozott cerebrovaszkuláris myogén tónusban súlyos traumás agykárosodás után

Az SHR-ekből származó MCA-k szignifikánsan megnövekedett myogén válasza 140 Hgmm-en a specifikus 20-HETE szintézis inhibitor HET0016 jelenlétében a normotenzív patkányok MCA-jában látott tónus szintjére csökkent. Traumás agysérülést követő SHR-ekben az MCA-k myogén tónusa szignifikánsan fokozott maradt, amit a HET0016 szintén blokkolt. A 20-HETE-ét szintetizáló cyp450 Cyp4a1 és Cyp4a3 izoformok cerebrovaszkuláris expressziója szignifikánsan megnőtt SHR-ekben a normotenzív állatokhoz képest, és ez nem változott traumás agykárosodás után. A TBI szignifikánsan csökkentette a Cyp4a1 cerebrovaszkuláris expresszióját normotenzív patkányokban (4. ábra).



4. ábra. Az agyi artériák hipertónia által kiváltott megnövekedett myogén tónusát nem befolyásolja a traumás agysérülés. **A:** Szisztolés vérnyomás Wistar-Kyoto (WKY) és spontán hipertóniás patkányokban (SHR) súlyos traumás agysérülést követően (WKY-TBI és SHR-TBI, n=6 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. TBI). **B:** Izolált artéria cerebri media (MCA) nyomás által kiváltott myogén válaszai ugyanazon patkánycsoportokban. Az érátmérőt az egyes MCA-k 80 Hgmm-en mért passzív átmérőjének százalékában fejezzük ki. A mellék ábra a vizsgált MCA-k

konstriktor válaszait mutatja az U46619 (10^{-7} mol/l) tromboxán A2 agonistával szemben (n=6 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. TBI). **C:** A konstriktor 20-HETE-t termelő citokróm P450 enzimek specifikus gátlásának hatása (HET0016-al) a vizsgált állatcsoportokból izolált MCA-k fokozott myogén tónusára (n=6 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. SHR; \$ $p < 0,05$ vs. SHR-TBI). **D:** A 20-HETE-t termelő citokróm P450 Cyp4a1 és Cyp4a3 izoformok mRNS expressziója a fenti állatcsoportok MCA-iban (n=5 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. TBI).

Megbeszélés

Az értékezés megelőző részeiben részletes tárgyaltuk, hogy az agyi autoreguláció, valamint annak központi vaszkuláris mechanizmusa, a nyomás-indukálta myogén válasz miként tartanak fent megközelítőleg állandó véráramlást a szisztémás vérnyomás változásai ellenére. Szintén demonstráltuk, hogy krónikus magasvérnyomás a myogén konstriktó fokozódásához vezet. Korábbi és itt bemutatott eredményeink szerint, egérben és patkányban egyaránt, ennek a mechanizmusnak a háttérben a magas vérnyomás által indukált fokozott cerebrovaszkuláris citokróm P450 ω -hidroxiláz expresszió és fokozott 20-HETE termelés állhat [16, 145, 146]. Ahogy azt korábban bemutattuk, a TBI aktiválja az agyi erek simaizom rétegében a BK_{Ca}-TRPV4 vazodilatátor útvonalat, ami az agyi erek myogén konstriktójának gyengüléséhez vezet. Fenti eredményeink szerint magasvérnyomás jelenléte esetén a TBI nem befolyásolja a citokróm P450 ω -hidroxiláz expressziót és a 20-HETE fokozott, nyomás-indukálta konstriktor hatását, és a trauma nem tudja aktiválni a BK_{Ca}-TRPV4 vaszkuláris útvonalat. Ebben feltehetőleg a 20-HETE BK_{Ca}-csatornán leírt gátló hatásának központi szerepe lehet [147], amit kísérletesen mi is kimutattunk. Ezen eredmények alapján a feltárt két cerebrovaszkuláris út közötti párbeszéd farmakológiai modulálásával, pl. a cerebrovaszkuláris 20-HETE termelés fokozásával a TBI által indukált autoregulációs diszfunkció befolyásolható lehet.

Összefoglalás

A téziszűzet első, autoregulációs vizsgálatokat bemutató részében bemutattam, hogy az autoregulációs funkció károsodását élettani szinten a cerebrovaszkuláris érfal intraluminális nyomás-indukálta összehúzódásának károsodása okozza, amelynek háttérben az adott kórállapottól függő molekuláris mechanizmusok állnak. Munkatársaimmal kimutattuk, hogy öregedésben a hipertóniához adaptálódott agyi erek a 20-hydroxieicosatetraén sav (20-HETE) – tranziens receptor potenciál csatorna 6 (TRPC6) konstriktor útvonal csökkent működése miatt nem képesek megfelelő nyomás-indukálta összehúzódást elérni, ezzel feltehetőleg a mikrokeringés hidrosztatikai/volumen terhelésén keresztül hozzájárulnak a korfüggő vér-agy gát zavar kialakulásához. Szintén kimutattuk, hogy a traumás agykárosodás (TBI) után látott csökkent konstriktor válasz, aminek hasonló kórélettani következményei vannak (agyi hiperémia, intracraniális nyomás növekedése, vér-agy gát zavar) a fentiekkel szemben nem egy konstriktor útvonal csökkent működése miatt alakul ki, hanem a TBI-t követő excesszív mitokondriális hidrogén-peroxid termelés vezet a kalcium-függő kálium csatorna (BK_{Ca})-tranziens receptor potenciál csatorna 4 (TRPV4) dilatátor út túl-aktiválásához. Szintén kimutattuk, hogy a trauma által előidézett cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz farmakológiailag effektíven csökkenthető, valamint a fokozott dilatátor válasz a bemutatott konstriktor útvonalon keresztül modulálható.

IV. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása: preklinikai modellektől az emberig

IV.1. A neurovaszkuláris kapcsolás szerepe a kognitív funkcióban

Bevezetés

Az agyi mikrokeringés patofiziológiás változásai kritikus szerepet játszanak az agyműködés pl. életkorral összefüggő hanyatlásában [148]. A neuronok energiaigénye nagy, az agynak pedig kevés tartalékkapacitása van. A megnövekedett neuronális aktivitás kiszolgálása miatt szükség van az oxigén- és glükózz szállítás időben és regionálisan illesztett, gyors növekedésére. Ezt egy „feed-forward” elven működő mechanizmus, a neurovaszkuláris kapcsolás biztosítja [46]. A neurovaszkuláris kapcsolás létrehozásában központi szerepet játszik a neurális aktiváció által kiváltott neuronális és endotheliális nitrogén-monoxid (NO) termelés [48, 51, 149], valamint az aktivált perivaszkuláris astrocytákból felszabaduló dilatátor arachidonsav metabolitok: epoxygenázok által termelt epoxyeikozatrién-savak (EET) és cyclooxygenáz eredetű prosztaglandinok [150-152]. Az NO, EET-k és prosztaglandinok kóros termelése és/vagy felszabadulása miatti neurovaszkuláris károsodást (szét-kapcsolást) többféle kórkép állatmodelljében valamint betegekben is demonstrálták [62, 63, 132]: öregedésben, elhízásban [153], hipertóniában [154], Alzheimer-kórban [155]. Bár a tápanyagok és az oxigén szállításának zavara nyilvánvalóan hátrányosan érinti a neuronok működését, mind az öregedés, mind a fent említett betegségek összetett funkcionális és fenotípusos változásokat idéznek elő az ideg- és gliasejtekben [156]. Ennek megfelelően az említett betegségek modelljeiben végzett vizsgálatok során kihívást jelent a neurovaszkuláris szét-kapcsolás specifikus szerepének megállapítása a kognitív károsodás kialakulásában.

Hipotézis és módszer

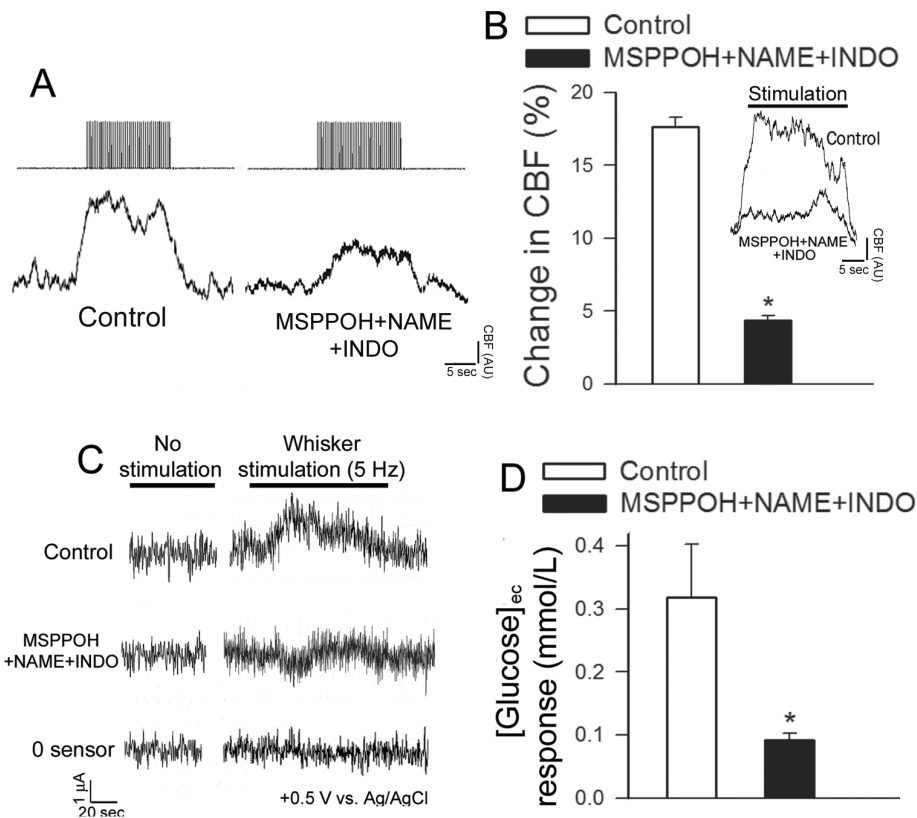
Az alább bemutatott vizsgálat feltevése az volt, hogy a neurovaszkuláris szét-kapcsolás, primer neuronális deficit hiányában, klinikailag szignifikáns kognitív károsodást (és egyéb agyi működési zavarokat) eredményez. Hipotézisünk tesztelésére neurovaszkuláris szét-kapcsolást indukáltuk egészséges fiatal egerekben az NO, EET és prosztaglandin szintézis specifikus farmakológiai gátlószereivel, majd felmértük az állatok bazális véráramlását, neurovaszkuláris válaszait, kiváltott neurális válaszait és szinaptikus folyamatait, valamint tanulását, memóriáját, szenzomotoros funkcióit és járáskoordinációját.

Eredmények

A neurovaszkuláris szét-kapcsolás állat modellje

Fiatal egészséges egerekben az NO, EET és prosztaglandin szintézis gátló szereivel történő szisztémás kezelést követően (a gátlószerek rövidítése alapján MSPPOH+NAME+INDO) a bajusz-stimuláció által kiváltott véráramlás növekedés a kontralaterális szomatoszenzoros kéregben szignifikánsan csökkent a vivő anyaggal kezelt állatok válaszaikhoz képest (5. ábra). A véráramlás növekedéssel párhuzamosan a szomatoszenzoros kéregben a neuronális aktiváció során az extracelluláris glükóz koncentrációja szintén megemelkedett, ami szignifikánsan csökkent az MSPPOH+NAME+INDO-vel kezelt állatokban (5. ábra). A neurovaszkuláris szét-kapcsolást indukáló farmakológiai kezelés nem okozott szisztémás hemodinamikai eltéréseket. A bazális agyi véráramlást (CBF) a szomatoszenzoros kéregnek megfelelően (koronalisan a bregmától 1-1,5 mm-re caudálisan) 7T térerejű kisállat MRI segítségével, arterial spin labeling szekvenciával határoztuk meg. A számított CBF értékek nem különböztek a kontroll és az MSPPOH+NAME+INDO csoport között. Eredményeink szerint az MSPPOH+NAME+INDO kezelés nem változtatta meg a szomatoszenzoros kéreg bazális neuronális aktivitását, sem a

kontralaterális bajusz-stimuláció által kiváltott (excitatorikus posztszinaptikus potenciált jellemző) mező potenciál válaszok amplitúdóját.

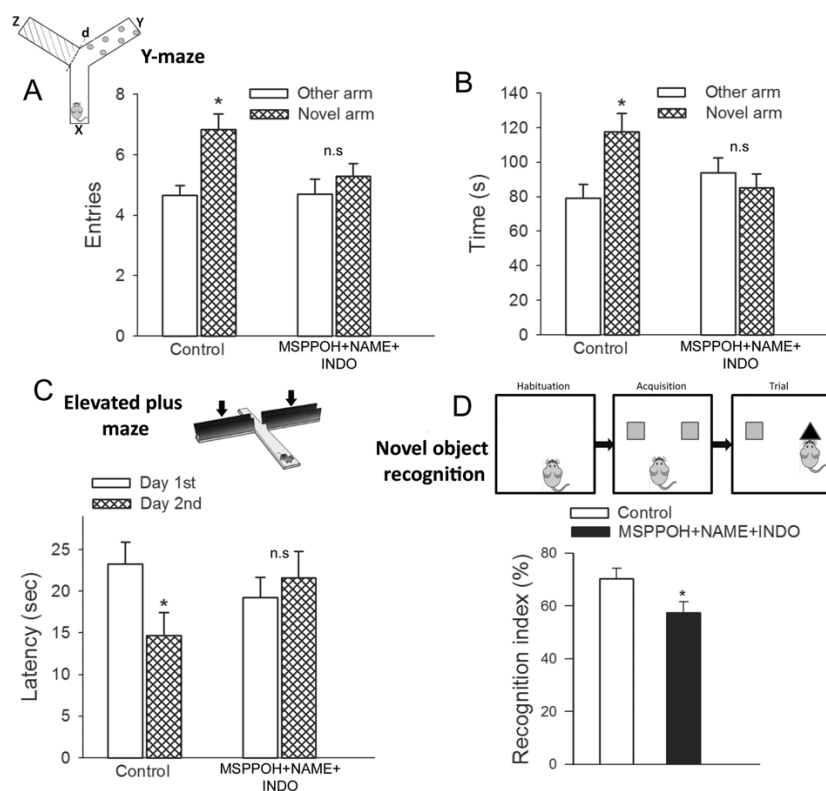


5. ábra. Kísérletileg indukált neurovaszkuláris szét-kapcsolás egerekben. (A) Az agyi véráramlás (CBF) reprezentatív kísérletes regisztrátuma laser Doppler szenzorról mérve a szomatoszenzoros kéregben ellenoldali bajusz-párna elektromos stimulációja során egérben (áram: 0,2 mA, impulzus időtartama: 0,3 ms, 2 Hz-en 30-30 sec. periódus) N-(metil-szulfonil)-2-(2-propinil-oxi)-benzol-hexánamid (MSPPOH), L-NG-nitroarginin-metil-észter (L-NAME) és indometacin (INDO) topikális adása előtt (Control, bal regisztrátum) és után (jobb regisztrátum). (B) A panel az MSPPOH+NAME+INDO kezelés hatásának összegzett adatait mutatja be bajusz-stimulációra adott CBF-válaszokra (kontroll: n=9, kezelt: n=6, * $p < 0,01$ vs. kontroll). (C) Eredeti regisztrátumok az extracelluláris glükóz ([glükóz]_{ec}) változásairól bajusz-stimuláció hatására (5 Hz, 2 perc), amperometriával, MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek szomatoszenzoros kérgében glükóz bioszenzorról mérve. „0 szenzor”: a glükóz szenzorról megegyező elektróda, biológiai jel érzékeléséhez szükséges enzimek nélkül. Az összefoglaló adatokat a (D) panel mutatja. Az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt állatokban, a neurovaszkuláris szét-kapcsolás következményeként, a bajusz-párna stimuláció által kiváltott glükóz válasz szignifikánsan csökkent (n=6 csoportonként, * $p = 0,002$ vs. kontroll).

A neurovaszkuláris szét-kapcsolást követően kognitív funkció zavar alakul ki

A neurovaszkuláris szét-kapcsolás a térbeli munkamemória károsodásához és az újdonságkereső magatartás csökkenéséhez vezetett. Ennek megfelelően a kontroll egerek szignifikánsan több időt töltöttek az Y-maze újként bemutatott karján, mint a korábban meglátogatott karokon. Ezzel szemben az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek az új karon. A kontroll egerek esetében az ún. transzfer latencia a kísérlet 2. napján szignifikánsan csökkent (~37%-kal) az 1. naphoz képest, ami megtartott tanulási képességet jelez. Ezzel szemben az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt

egereknél a transzfer latencia a két vizsgálati napon hasonló volt, jelezve a tanulási képesség károsodását. Ezt követően az egerek teljesítményét a „novel object recognition” (új tárgy felismerési) tesztben is mértük. A kontroll egerek lényegesen hosszabb ideig vizsgálták az új objektumot (a kalkulált felismerési index (RI) $70 \pm 2,8\%$ -os volt). Az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek nem mutattak fokozott érdeklődést az új objektum iránt, RI-jük ($59 \pm 4\%$) szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoportnál (6. ábra).



6. ábra. A neurovaszkuláris szét-kapcsolás a tanulás és a memória károsodását okozza. (A és B)

Egerek térbeli memória tesztelése Y-maze-ben (sematikus kép labirintuson kívüli jelölésekkel: x: kezdőkar, y: „másik” kar, z: új kar). Kontroll állatok intakt térbeli memóra funkciójára utal, hogy az újként bemutatott karba többször léptek be, és abban több időt töltöttek, mint az ismert karban. Az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek térbeli memóriája károsodott: az újként bemutatott karba az ismert karral azonos számban léptek be, és ott hasonlóan hosszú időt töltöttek (n=20 csoportonként). (C) A tanulást az „elevated plus maze” tanulási protokolljával mértük. A kontroll egerek szignifikánsan csökkent transzfer latenciát mutattak a 2. napon ($*p=0,027$ vs.1.nap), ami intakt hippocampus-függő tanulást jelez. Az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek transzfer latenciája hasonló volt az 1. és 2. napon, az egerek tanulási képessége csökkent (n=20 csoportonként). (D) Az új tárgy felismerési tesztet egerek felismerési memóriájának értékelésére használjuk. Az ismert és ismeretlen objektumok vizsgálata alapján számolt felismerési index (RI, az új objektum vizsgálatára fordított időt a teljes tárgyvizsgálathoz viszonyítva) szignifikánsan csökkent MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerekben (n=20 csoportonként, $*p<0,05$ vs. Kontroll). INDO: indometacin; MSPPOH: N-(metil-szulfonil)-2-(2-propinil-oxi)-benzol-hexánamid; l-NAME: l-NG-Nitroarginin-metil-észter.

A hippocampus-függő tanulás és memória szinaptikus folyamatai nem térnek el a kísérleti csoportokban

A kísérleti csoportokban hippocampális corticális szeletek gyrus dentatusában a perforáns pálya 4x100 Hz-es tetániás stimulációját követően mértük a hosszú távú (long term) potenciálódást. A fEPSP meredeksége hasonlóan nőtt a kontroll és az MSPPOH+NAME+INDO kezelt csoportokban a 60 perces kísérleti idő alatt. A perforáns pálya

elektromos stimulációja (5 μ A lépésekkel 100 μ A-ig növelve) által kiváltott excitatórikus posztszinaptikus potenciálok normalizált nagysága szintén nem különbözött a két csoport között.

Megbeszélés

Tudomásunk szerint a fent részletezett eredmények voltak az elsők, amelyek bemutatták, hogy a farmakológiailag indukált neurovaszkuláris szét-kapcsolás egerekben kognitív károsodással jár. Fontos kiemelni, hogy az alkalmazott farmakológiai kezelés nem befolyásolta a kérgi kiváltott válaszokat és a szinaptikus működést jelző paramétereket, valamint a bazális agyi véráramlást, vagyis a látott kognitív funkció romlás minden bizonnyal a csökkent reaktív hiperémia következménye volt. Eredményeinknek fontos klinikai jelentősége van. Először is kimutatták, hogy számos patofiziológiai állapot hátrányosan befolyásolja az értágító NO, EET-k és/vagy prosztaglandinok szintézisét, feltehetőleg elősegítve a neurovaszkuláris szét-kapcsolást. Például számos kardiovaszkuláris kockázati tényező, köztük a magas vérnyomás, a diszlipidémia, a dohányzás és az elhízás, amelyek az idős betegek kognitív hanyatlásának fontos kockázati tényezői [157, 158], csökkentik a NO biohasznosulását a mikrokeringésben az oxidatív stressz elősegítésével, az endotheliális NO-szintáz szétkapcsolásával, illetve gátlásával. Az oxidatív stressz és az endothel diszfunkció befolyásolja az arachidonsav metabolizmusát, csökkenti az értágító prosztaglandinok és EET-k termelését, és fokozza az arachidonsav vazokonstriktor metabolitjainak, például a 20-HETE-nek a termelését [132]. Az értágító arachidonsav metabolitok szintézisének károsodása szerepet játszik az IGF-1 hiányával összefüggő neurovaszkuláris szét-kapcsolásban is (ld. később). Másodszor, az értágító NO, EET-k és/vagy prosztaglandinok szintézisét megzavaró farmakológiai kezelések és étrendi, életmódbeli tényezők ronthatják a neurovaszkuláris kapcsolást, és ezáltal a kognitív funkciót. Például kimutatták, hogy az értágító arachidonsav metabolitok szintézisének farmakológiai gátlói károsítják a neurovaszkuláris kapcsolást emberben [159, 160]. Eredményeink szerint a szisztémás hatások által kiváltott, a szomatoszenzoros kéregben kimutatott neurovaszkuláris szét-kapcsolás jelezheti a kérgi és a hippocampális funkció károsodását. Ennek az eredménynek fontos jelentősége van azon humán vizsgálatok eredményeinek értelmezésében, amelyekben a neurovaszkuláris kapcsolás változásait gyakran jellemzik a szomatoszenzoros kéreg illetve az occipitalis lebeny szenzoros ingerekre adott válaszaival [160].

Összefoglalás

Eredményeink szerint izolált neurovaszkuláris szét-kapcsolás (a neurovaszkuláris hiperémiás válasz csökkenése, károsodása) a kognitív funkció károsodásával jár. Különböző kognitív funkció-zavarral járó népbetegségek patofiziológiai folyamataiban ennek közvetlen szerepe lehet, ezért terápiás megelőzése vagy vissza fordítása kiemelt jelentőségű. A következőkben ez utóbbira szeretnék példát mutatni!

IV.2. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása öregedésben: a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szerepe és annak farmakológiai csökkentése

Bevezetés

Irodalmi adatok szerint a neurovaszkuláris kapcsolás idős korban károsodott [61-64], ami (fenti eredményeink alapján is) valószínűleg hozzájárul a kérgi funkciók életkorral összefüggő hanyatlásához [161, 162]. Ennek megfelelően, az idős emberek és betegek neurovaszkuláris kapcsolását javító terápiás beavatkozások számos, életkorral összefüggő neurológiai diszfunkciót javíthatnak. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az öregedés a NADPH-oxidáz-eredetű reaktív oxigén gyökök (ROS) fokozott termelésével jár az agyi mikrovaskulátúrában, ami, valószínűleg endothel diszfunkció kialakulásán keresztül, az NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenésével [61, 62, 155, 163] hozzájárul az idős egerekben látott neurovaszkuláris károsodáshoz [163]. Ezen eredmények alapján logikus az a feltételezés, hogy az endothel funkciót javító gyógyszeres kezelések képesek javítani a neurovaszkuláris kapcsolást idős korban. A növényi eredetű polifenol resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene)-ről kimutatták, hogy laboratóriumi állatokban jelentős endothélvédő hatást fejt ki az aortában és a perifériás keringés ereiben mind az öregedés során, mind vaszkuláris rizikófaktorok jelenlétében [164-168]. Szintén ismert, hogy a resveratrol növeli az endothéliumból származó NO biohasznosulását, és gátolja a NADPH-oxidázokat a nagy erekben [165, 166, 169-171].

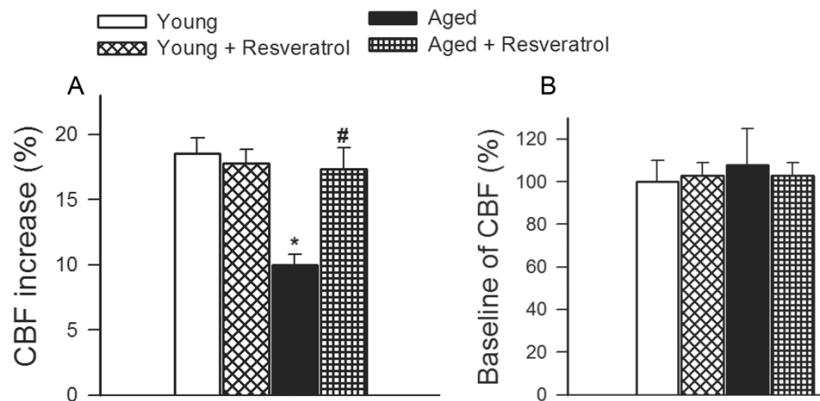
Hipotézis és módszer

A következőkben részletezett vizsgálatok célja annak a hipotézisnek a tesztelése volt, hogy a resveratrol javítja az agyi erek endothel funkcióját, és ezáltal visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerekben. E cél elérése érdekében idős (2 év) egereket resveratrollal kezeltünk, majd teszteltük a neurovaszkuláris kapcsolást és a cerebromicrovaszkuláris endothel funkciót. Felmértük a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz markereit, valamint a NADPH-oxidáz expresszióját. Az *in vivo* eredmények alátámasztására *in vitro* is vizsgáltuk a resveratrol ROS termelésre és NADPH-oxidáz expressziójára gyakorolt hatását idős állatokból származó cerebromicrovaszkuláris endothel sejtekben.

Eredmények

Resveratrol kezelés visszaállítja a csökkent neurovaszkuláris kapcsolást idős egérben: az NO szerepe

A kontralaterális bajusz-stimuláció által a szomatoszenzoros kéregben indukált véráramlás (CBF)-emelkedés csökkent idős (2 év) egérben a fiatal állatok (3 hónap) hiperémiás válaszaihoz képest. 10 napos resveratrol-kezelés szignifikánsan megnövelte az idős egerekben látott csökkent szomatoszenzoros stimulus által kiváltott áramlás-válaszokat, visszaállítva a neurovaszkuláris kapcsolást a fiatal egereknél megfigyelt szintre. A resveratrol-kezelés nem befolyásolta a neurovaszkuláris kapcsolást fiatal állatokban, valamint nem befolyásolta a kiindulási alap véráramlási szintet sem fiatal, sem idős egerekben (7. ábra). Fiatal állatokban a NO szintáz-inhibitor L-NAME (perfundált koponya ablakra történt topikális adása után) szignifikánsan csökkentette a bajusz-stimuláció által kiváltott véráramlás válaszokat a szomatoszenzoros kéregben, megszüntetve az életkor-indukálta különbséget. Idős állatokban az L-NAME beadása nem volt hatással a csökkent neurovaszkuláris kapcsolásra. Ezzel szemben a resveratrollal kezelt idős egerekben az L-NAME szignifikánsan csökkentette a bajusz-stimuláció által kiváltott, megnövekedett véráramlás-válaszokat, ami arra utal, hogy a resveratrol-kezelés NO közvetítésével állította vissza a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerekben.



7. ábra. A resveratrol kezelés visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerekben. A: A resveratrol-kezelés (200 mg/kg, 10 napig) hatása a bajusz-párna stimuláció által kiváltott szomatoszenzoros véráramlás emelkedésre (CBF) és bazális véráramlásra **(B)** fiatal (Young, 3 hónap) és idős (Aged, 24 hónap) egerekben (n = 8 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged).

Resveratrol kezelés visszaállítja a csökkent endothel-függő, acetil-kolin által indukált, NO mediálta cerebrovaszkuláris válaszokat idős egerekben

Az endothel-függő dilatációt kiváltó acetil-kolin (ACh) topikális alkalmazása a lokális agyi véráramlás szignifikáns növekedését eredményezte fiatal egerek szomatoszenzoros kérgében. Az ACh által kiváltott CBF-növekedés szignifikánsan (~50%) csökkent idős egerekben, amit a resveratrol kezelés szignifikánsan megnövelt (visszaállítva a válaszokat a fiatal egereknél megfigyelt szintre). Az L-NAME szignifikánsan gátolta az ACh által kiváltott CBF válaszokat mind a fiatal állatokban, mind a resveratrollal kezelt idős egerekben, míg a kezeletlen idős egerekben nem fejtett ki szignifikáns hatást.

A NADPH-oxidáz inhibitor apocinin visszafordítja a neurovaszkuláris diszfunkciót idős egerekben

A bajusz-stimulációt követő CBF válaszokat idős állatokban szignifikánsan növelte a NADPH-oxidáz inhibitor apocininnel végzett topikális (koponya ablakon keresztül, az agykéregre közvetlenül adott) kezelés.

A resveratrol kezelés csökkenti az öregedés által kiváltott oxidatív stresszt

A kérgi agyszövet 3-nitrotirozin tartalma szignifikánsan megemelkedett idős egerekben, ami összhangban van az idős agy leírt, fokozott oxidatív/nitrozatív stresszével [172, 173]. Resveratrol-kezelést követően az idős egerek agyszövetében szignifikánsan csökkent a 3-nitrotirozin szint, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a resveratrol antioxidáns hatásai központi szerepet játszanak az öregedéssel járó mikrovaszkuláris védőhatásában.

In vitro resveratrol kezelés csökkenti az oxidatív stresszt öreg mikrovaszkuláris endothel sejtekben

A resveratrol cerebrovaszkuláris antioxidáns hatásának *in vitro* alátámasztására DCF fluoreszcencia módszerrel értékeltük annak hatását a celluláris ROS termelésre idős állatokból származó cerebrovaszkuláris endothel sejteken (CMVEC). Azt találtuk, hogy az idős állatokból származó CMVEC-ben a ROS-termelés jelentősen megnőtt a fiatal állatokból származó sejtekhez képest, amit a resveratrol kezelés szignifikánsan csökkentett, megszüntetve a két csoport közötti különbséget.

Resveratrol-kezelés csökkenti a NADPH-oxidázok expresszióját idős egerek agyában

Idős egerek agykérgében a NADPH-oxidáz *Nox1*, *Nox2* és *Nox4* alegységeinek mRNS-expressziója a fiatal egerekhez képest szignifikánsan növekedett. Idős egerek resveratrol-kezelése a NADPH-oxidáz-alegységek expresszióját lecsökkentette a fiatal állatokban látott szintre.

In vitro resveratrol kezelés csökkenti a NADPH-oxidázok expresszióját öreg mikrovaszkuláris endothel sejtekben

In vivo eredményeink alátámasztása céljából kimutattuk, hogy idős cerebromikrovaszkuláris endothel sejtekben a NADPH-oxidáz *Nox2* és *Nox4* alegységeinek mRNS expressziója a fiatal sejtekhez képest növekedett, amit resveratrol hozzá adása szignifikánsan csökkentett.

Megbeszélés

Korábbi vizsgálatokkal összhangban kimutattuk, hogy az öregedés jelentős neurovaszkuláris diszregulációhoz [163] vezet, a szinaptikus aktivitás által kiváltott véráramlás válaszok jelentős csökkenésével. A neurovaszkuláris kapcsolás életkorral összefüggő károsodásának jelentőségét az adja, hogy ok-okozati összefüggésben állhat összetett kérgi funkciók, köztük a kognitív funkció hanyatlásával [161, 162]. Munkatársaimmal először demonstráltuk, hogy a neurovaszkuláris kapcsolás öregedés okozta csökkenése helyreáll resveratrol kezelést követően. A kulcsfontosságú homeosztatiszta mechanizmus helyreállítása valószínűleg jótékony hatással van az agyműködésre öregedés során. Így logikus a feltevés, hogy a neurovaszkuláris kapcsolás javulása hozzájárul a resveratrol-kezelés kognitív funkcióra gyakorolt pozitív hatásához idős rágcsálókban [174-176]. Eredményeinknek fontos klinikai jelentősége van. Emberben a resveratrol jól tolerálható, jelentős toxicitásról nem számoltak be [177]. Bár a resveratrol biohasznosulása a parenchymás szövetekben viszonylag alacsony, a vérrel közvetlenül érintkező vaszkuláris endothélium ideális célpont a resveratrol és aktív metabolitjai számára [177]. Állatkísérletes eredményeink transzlációs értékét mutatja, hogy embereknél a rövid távú resveratrol kezelés dózisfüggően megnövelte az agyi véráramlást kognitív feladat végrehajtása közben [178]. Ezek alapján további vizsgálatoknak kell tisztáznia, hogy idős betegeknél rövid és/vagy hosszú távú resveratrol bevitele javítja-e a neurovaszkuláris kapcsolást, és csökkenti-e az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás előfordulását vagy súlyosságát [179].

Egyre több kísérleti bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az endotheliális NO-termelés fontos szerepet játszik a neurovaszkuláris kapcsolásban [51, 55, 180]. A resveratrol kezelés visszaállította a neurovaszkuláris kapcsolást idős állatokban, eredményeink szerint az endotheliális NO által közvetített cerebro-mikrovaszkuláris dilatáció javításán keresztül.

Az öregedés által kiváltott cerebrovaszkuláris endothel diszfunkcióban központi szerepet játszik a ROS által csökkentett NO termelés, illetve fokozott lebomlás. Munkatársaimmal kimutattuk, hogy a NADPH-oxidáz gátlása visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást és az endothel-függő véráramlás növekedést idős egerekben, valamint resveratrol kezelés csökkenti a NADPH-oxidáz szignifikánsan fokozott expresszióját idős egerek agyában és cerebromikrovaszkuláris endothel sejtjeiben. Szintén, az öreg egerek agyában megnövekedett 3-nitrotirozin-szintet a resveratrol kezelés csökkentette. Az endotheliális NO-ból O_2^- reaktív szabadgyök hatására történő ONOO⁻ képződés az NO biológiai hatásának csökkenésével jár [181, 182]. Mindez arra utal, hogy az öregedés során látott csökkent endotheliális véráramlás növekedés az NO fokozott oxidatív átalakulásának következménye. Úgy gondoljuk, hogy a resveratrol kezelés az oxidatív stressz mérséklésével állítja helyre az endothélium-függő cerebro-mikrovaszkuláris dilatációt és a neurovaszkuláris kapcsolást idős

egerekben. A resveratrol kezelés cerebro-mikrovaszkuláris antioxidatív mechanizmusaiban központi szerepet játszhat a NADPH-oxidáz expressziójának csökkenése az idős egeragyban, valamint idős egerek agyából izolált endothel sejtekben.

Összefoglalás

Resveratrol kezelés visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerek agyában, ami valószínűleg hozzájárul a magasabb kérgi funkciók javulásához. Ebben a NADPH-oxidáz eredetű oxidatív stressz hatékony csökkentése, és a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkció következményes javulása központi szerepet játszik. A következőkben azokat az életkorral összefüggő neuroendokrin eltéréseket tárgyalom, amelyek (a fenti oxidatív mechanizmusok hátterében) központi szerepet játszhatnak az öregedés során kialakuló neurovaszkuláris szét-kapcsolásban.

IV.3. Az inzulinszerű növekedési faktor hiánya neurovaszkuláris szét-kapcsolást okoz

Bevezetés

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy neuroendokrin mechanizmusok fontos szerepet játszanak az életkorral összefüggő vaszkuláris elváltozásokban [183, 184]. Ezek közül talán a legfontosabb a szérumban inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) szintjének életkorral összefüggő csökkenése, ami hozzájárul az életkorral kialakuló mikrovaszkuláris károsodásokhoz és kognitív hanyatláshoz [183]. A neurovaszkuláris egység sejtjei: a neuronok, vaszkuláris endotélsejtek és astrocyták [46, 149] jelentős mértékben expresszálnak IGF-1 receptorokat, és ismert célpontjai az IGF-1-nek [183]. Említettem, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat mechanizmusában a neuronális glutamát-által indukált endotheliális NO-nak [48, 51, 149], valamint astrocyta eredetű arachidonsav-származékoknak központi szerepe van. Ebből a szempontból fontos, hogy az IGF-1 hiány endothel diszfunkcióhoz és a NO biohasznosulásának csökkenéséhez vezet a perifériás keringésben [184], valamint az IGF-1 befolyásolja a celluláris arachidonsav metabolizmust is [185-188].

Hipotézis és módszer

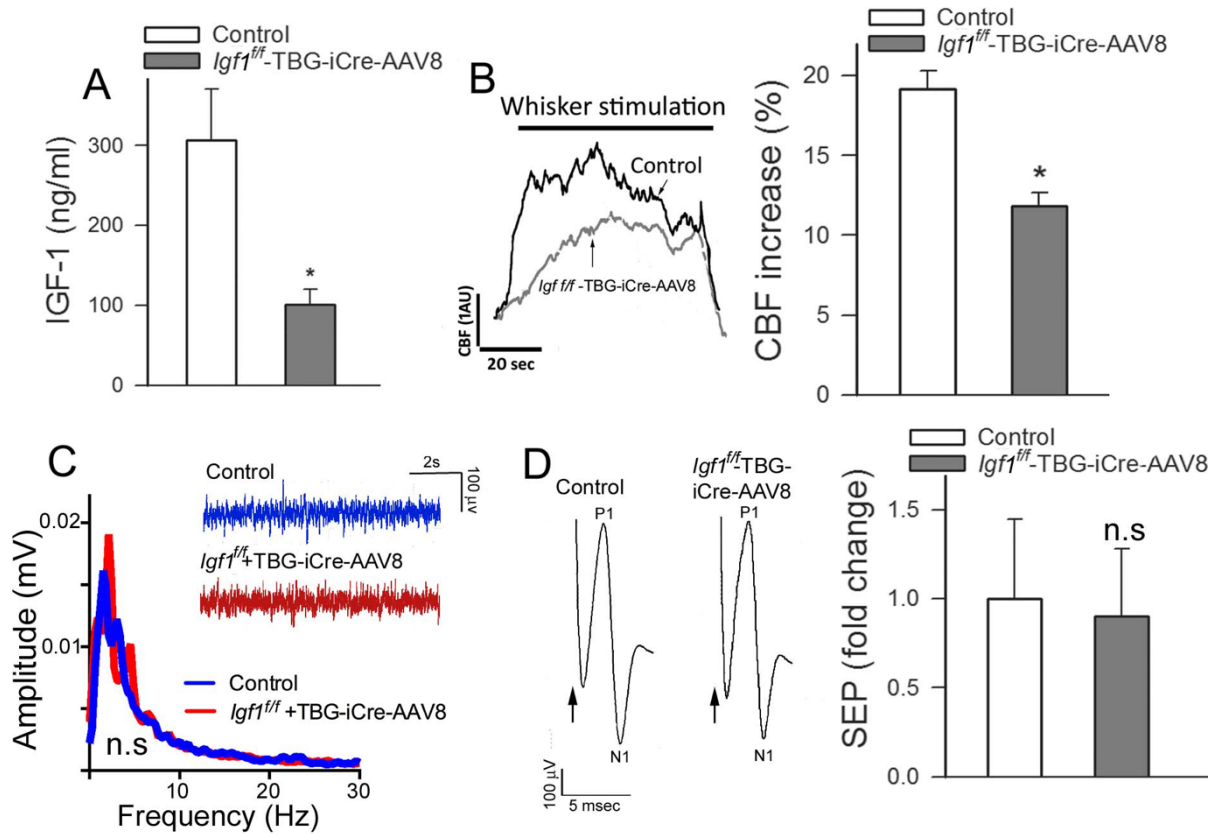
Az alább bemutatott vizsgálatokban azt a feltevést teszteltük, amely szerint az IGF-1 befolyásolja az NO és a vazodilatátor eikozanoid gliotranszmitterek szintézisét/felszabadulását az agyi mikrocirkulációban, valamint, hogy az alacsony szérumban IGF-1 szint a fenti mechanizmusok diszregulációján keresztül károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást. Hipotéziseink ellenőrzésére a felnőttkori, izolált endokrin IGF-1 hiány Cre-lox technológiával előállított új egérmódellet használtuk. A hepatikus IGF-1 termelés adenovírus-asszociált kiütését követően (*Igfl^{ff}* + TBG-Cre-AAV8) [25] megvizsgáltuk az állatok neurovaszkuláris kapcsolatát, az eikozanoid gliotranszmitterek szintézisét, az astrocyta glutamát receptorok expresszióját, valamint a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkciót. Végül, a neurovaszkuláris funkciót az állatok viselkedési vizsgálatainak eredményeivel korreláltuk.

Eredmények

Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást és a kognitív funkciót

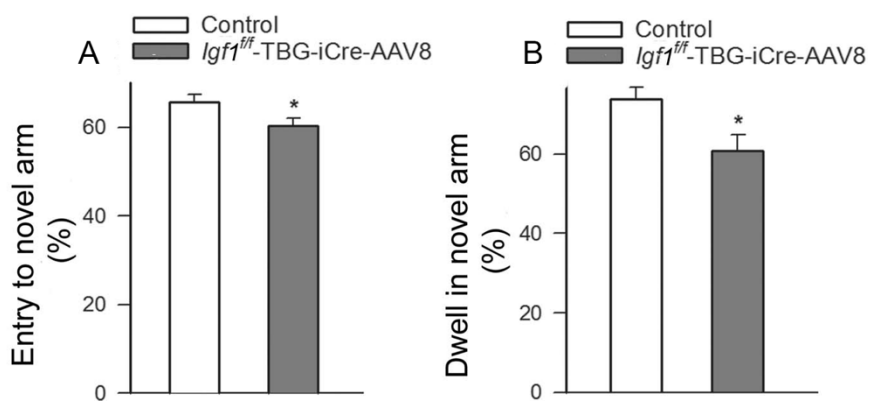
A TBG-Cre-AAV8-al injektált egerek szérumban IGF-1-szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a TBG-eGFP-AAV8-at kapó kontroll egereké (8. ábra). A bajusz stimuláció által a kontralaterális szomatoszenzoros kéregben indukált véráramlás (CBF) növekedés szignifikánsan csökkent IGF-1-hiányos egerekben. Az IGF-1 hiány csökkentheti a funkcionális hiperémiát azáltal, hogy károsítja a szenzoros stimuláció által kiváltott idegi

aktivitást. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára spontán és kiváltott idegi aktivitást regisztráltunk kontroll és IGF-1 hiányos egerekben, és azt találtuk, hogy az elektrokortikogram amplitúdója és frekvencia eloszlása, valamint a bajusz párna aktiválása által generált szomatoszenzoros kiváltott válaszok amplitúdója nem különbözött a kontroll és az IGF-1 hiányos egerek között (8. ábra).



8. ábra. Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást. **A:** az *Igf1* adeno-asszociált kondicionális knock-down-ja (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) szignifikánsan csökkenti a keringő IGF-1 szintjét a kontroll állatokhoz képest (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-eGFP-AAV8) ($*p < 0,05$ vs. Control). **(B)** Az agyi véráramlás (CBF) kísérletes regisztrátumai laser Doppler szenzorral mérve a szomatoszenzoros cortex felett ellenoldali bajusz-párna stimuláció során (5 Hz) kontroll és IGF-1-hiányos egerekben. 1 AU a CBF ~5%-os növekedésének felel meg az alapvonalhoz képest. A jobb oldali panel a CBF válaszok összesített adatait mutatja (Δ AUC az alapvonal %-ában; $n = 12$, $*p < 0,001$ vs. Control). **(C)** A cortikális elektromos aktivitás amplitúdója és frekvenciaeloszlása közel azonos a kontroll és IGF-1-hiányos egerekben ($n = 6$, $p = 0,4$). **(D)** A szomatoszenzoros kéregben az ellenoldali bajuszpárna stimulációja által kiváltott szomatoszenzoros kiváltott potenciál (SEP) válaszok hasonlóak a kontroll és az IGF-1-hiányos egerekben (a nyíl az inger alkalmazását jelzi), a mezőpotenciálok negatív hullámának amplitúdója (N1) nem különbözik a kontroll és az IGF-1-hiányos egerek között ($n = 6$, $p = 0,6$).

Amint azt az értekezés korábbi részében részletesen bemutattam, a neurovaszkuláris kapcsolás szelektív, kísérletes károsítása a kognitív funkció jelentős károsodásával jár. Jelen vizsgálatunkban a hippocampus-függő térbeli memória tesztelése során a kontroll egerek gyakrabban léptek be a Y-maze újként bemutatott karjába, mint az IGF-1 hiányos egerek, valamint ott több időt töltöttek el. Mindez azt jelzi, hogy az IGF-1 hiány által kiváltott neurovaszkuláris szét-kapcsolás a térbeli munkamemória károsodásával és az újdonságkereső magatartás csökkenésével is összefüggésbe hozható (9. ábra).



9. ábra. Az IGF-1 hiány a kognitív funkciók romlását okozza. A-B: Az IGF-1-hiányos állatok (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) károsodott térbeli memóriát mutattak, amint azt a Y-maze új karjába (novel arm) történő belépések számának csökkenése (* $p = 0,001$ vs. Controll), valamint a rövidebb explorációs idő is mutatja (dwell in novel arm: az új karban eltöltött idő a teljes explorációs idő %-ban, $p = 0,01$ vs. Controll, $n = 20$ csoportonként).

Az IGF-1 hiány károsítja a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkciót, ami hozzájárul a neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz

A kontroll állatokban az NO-szintáz inhibitor L-NAME szignifikánsan csökkentette az ellenoldali bajusz stimuláció által kiváltott CBF válaszokat. Az IGF-1 hiányos állatokban az L-NAME hatása csökkent, ami arra utal, hogy az IGF-1 hiány rontja a neurovaszkuláris kapcsolat NO-mediálta részét. Az endothel-függő dilatátor acetil-kolin (ACh) topikális cortikális alkalmazása a CBF szignifikáns növekedését eredményezte kontroll egerekben, azonban az ACh-indukált CBF válaszok szignifikánsan csökkentek IGF-1-hiányos egerekben. IGF-1 hiányos egerekben az agykéreg 3-nitrotirozin tartalma szignifikánsan megemelkedett, ami egyrészt az NO-szintáz alegység *Nos3* csökkent expressziójával, valamint a NADPH-oxidáz *Nox1* és *Nox2* alegységek megnövekedett expressziójával járt együtt.

Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolat glutamát-indukálta mechanizmusait

Kontroll egerekben azt találtuk, hogy a metabotróp glutamát-receptor blokkoló MPEP és az NMDA-receptor blokkoló D-AP5 szignifikánsan csökkentette a kiváltott neurovaszkuláris CBF válaszokat, valamint IGF-1 hiányos állatokban az MPEP és D-AP5 hatása szignifikánsan csökkent. IGF-1-hiányos egerekben a glutamát által kiváltott CBF válaszok szignifikánsan csökkentek a kontroll egerekhez képest, miközben az IGF-1 hiány nem változtatta meg a neuronális aktiváció által kiváltott glutamát felszabadulását. Ugyanakkor, az IGF-1 hiány diszregulálta a metabotróp glutamát-receptorok (*Grm2*, *Grm4*, *Grm5*) és az NMDA-receptorok (*Grin1* és *Grin2*) kifejeződését izolált astrocytákon.

Az IGF-1 hiány a neurális aktiváció által kiváltott gliotranszmitterek diszregulációjához vezet, ami hozzájárul a neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz

Kontroll állatokban a ciklooxygenáz inhibitor indometacin és a P450 epoxigenáz inhibitor MS-PPOH szignifikánsan csökkentette a neurális aktiváció által kiváltott CBF válaszokat, azonban az IGF-1-hiányos állatokban az indometacin és az MS-PPOH hatásai csökkentek. A vazokonstriktor 20-HETE szintézisének specifikus inhibitora (citokróm P450 ω -hidroxiláz inhibitor HET0016) fokozta az IGF-1 hiányos állatok csökkent neurovaszkuláris válaszait. Ezt támogatva folyadék kromatográfiás-tömeg spektrometriás (LC/MS) méréseink kimutatták, hogy IGF-1 hiányos állatok corticális szelet preparátumaiban glutamát-stimulációt követően kontroll állatokhoz képest az értágító 14,15-EET csökkent termelődése, valamint a konstriktor 20-HETE fokozott termelése látható. Szintén, az eikozanoid gliotranszmitterek

szintézisében részt vevő *Cyp2c55* astrocyta expressziója csökkent, míg a 20-HETE-t termelő ω -hidroxiláz *Cyp4a10* expressziója nőtt IGF-1 hiányos egerekben.

Megbeszélés

Munkatársaimmal elsőként mutattuk ki, hogy a szérumban IGF-1 hiány szignifikáns neurovaszkuláris diszregulációhoz vezet a neurovaszkuláris kapcsolás károsításán keresztül. Amint az a kísérletes neurovaszkuláris szét-kapcsolás állat modelljében, valamint öreg egerekben is látható volt, az IGF-1-hiányos egerekben a neurovaszkuláris szét-kapcsolás a kognitív funkciók károsodásával jár. Itt fontos kiemelni, hogy emberben az IGF-1-hiány progresszív kognitív diszfunkcióval jár, amely a keringő IGF-1-szint növelésével visszafordítható [183]. A téziszűzet következő részében bemutatott vizsgálatunk felveti, hogy ebben az IGF-1 hiánnyal asszociált neurovaszkuláris diszfunkció központi szerepet játszhat.

A mikrovaszkuláris endothelsejtek közvetlenül ki vannak téve a keringő IGF-1 hatásának, valamint fokozottan expresszálnak IGF-1 receptorokat [184]. Úgy tűnik, hogy IGF-1 hiányos egerekben a neurovaszkuláris csatlós L-NAME-érzékeny, NO által közvetített rész csökken. Ez arra utal, hogy az endothel diszfunkció is hozzájárul a neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz IGF-1 hiány esetén [163], hasonlóan az öreg fenotípus eltéréseihez [163, 189]. Feltehetőleg az IGF-1 hiány a fokozott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz által (csökkentett NO felszabadulást okozva) vezet endothelialis diszfunkcióhoz és károsodott vazodilatációhoz. Ezt támasztja alá, hogy az IGF-1-hiányos egerek fokozott agyi és cerebrovaszkuláris ROS-termelést mutatnak [229], primér endothelsejtek IGF-1-gyel történő kezelése csökkenti a celluláris ROS képződést [190], valamint az IGF-1-hiányos egerek agyában megnövekedett a 3-nitrotirozin szintje, amely a fokozott ONOO-képződés biomarkere.

A neurovaszkuláris kapcsolásban a neuronális glutamát-által indukált, astrocyta eredetű arachidonsav metabolitok (EET-k, prosztaglandinok) is fontos szerepet játszanak [191]. Elsőként mutattuk be munkatársaimmal, hogy az IGF-1 hiány megváltoztatja az astrocyták fenotípusát, károsítva a neurovaszkuláris kapcsolás astrocyták által közvetített részét. Kimutattuk, hogy az IGF-1 hiány rontja a glutamát által közvetített gliovaszkuláris kapcsolási mechanizmusokat, azonban nem befolyásolja a glutamát neuronokból történő felszabadulását. Az IGF-1 az astrocyták glutamát receptor expressziójának csökkenéséhez, valamint az eikozanoid és prosztaglandin gliotranszmitterek szintézisének diszregulációjához vezet oly módon, hogy azok egyensúlyát a dilatátor hatású mediátoroktól a konstriktorok felé tolja el. Fontos megjegyezni, hogy az NO gátolja a konstriktor 20-HETE termelődését, vagyis az NO hiánya szintén hozzájárulhat a gliotranszmitter egyensúly megbomlásához.

Összefoglalás

Eredményeink szerint a szérumban IGF-1-hiány funkcionális és fenotípusos változásokat okoz a cerebrovaszkuláris endothel sejtekben és astrocytákban, ami által neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz, és kognitív károsodáshoz vezet. A továbbiakban ezen eredményeinkre épített humán vizsgálatunk eredményeit mutatom be.

IV.4. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idősebb embereknél: az inzulinszerű növekedési faktor szerepe

Bevezetés

Amint azt a megelőző vizsgálatok során kifejtettem a neurovaszkuláris kapcsolás (NVC) életkorral összefüggő károsodása hozzájárul a vaszkuláris kognitív károsodás és demencia patogeneziséhez [192]. Azok a mechanizmusok, amelyek révén az öregedés rontja a neurovaszkuláris kapcsolást magukban foglalják a nitrogén-monoxid (NO) endothelialis

termelésének csökkenését [48, 51, 149] és a neurovaszkuláris egység astrocytáinak diszfunkcióját [192]. Mindehhez hozzájárulnak az öregedéssel összefüggő fokozott celluláris oxidatív stressz és mitokondriális diszfunkció [163, 192-195]. Ezekben a mechanizmusokban az életkorral csökkenő keringő IGF-1-nek központi szerepe lehet [183, 196-200]. Mint azt feljebb bemutattam, IGF-1 hiány transzgenikus egérmodelljében a neurális aktiváció által indukált, endothélium- és astrocyta-függő NVC válaszok károsodnak, hasonlóan az öregedés hatásaihoz [184, 201]. Fontos kiemelni, hogy az IGF1R jelátvitel genetikai blokkolása specifikusan az endothel sejtekben (*VE-Cadherin-Cre^{ERT2}/Igf1^{fl/fl}*) vagy az astrocytákban (*GFAP-Cre^{ERT2}/Igf1^{fl/fl}*) szintén jelentősen rontja ezen egerek NVC válaszait, hasonlóan a keringő IGF-1 hiány és öregedés hatásaihoz [202, 203]. Mindezek ellenére az öregedéssel kialakuló IGF-1 hiány neurovaszkuláris hatásait emberben nem vizsgálták.

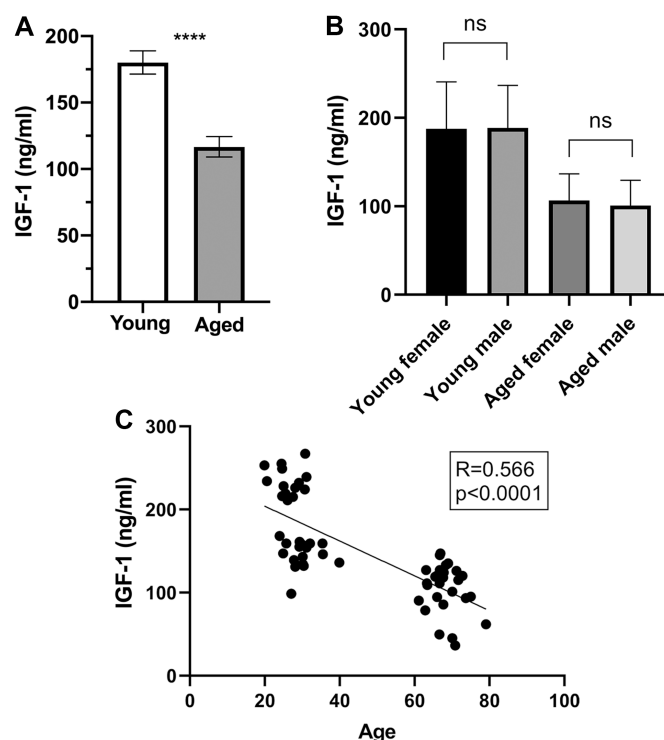
Hipotézis és módszer

Az itt bemutatott vizsgálatok feltevése az volt, hogy a szérumban IGF-1 szintjének csökkenése idős emberekben korrelál az NVC válaszok életkorral összefüggő csökkenésével. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez egy keresztmetszeti felmérésben vizsgáltunk egészséges fiatal (18-40 éves) és idős (≥ 60 éves) alanyokat. Felmértük a szérumban IGF-1 szintet, a bazális agyi véráramlást (CBF) fáziskontraszt MRI használatával és az NVC válaszokat transcranialis Doppler szonográfiával.

Eredmények

A szérumban IGF-1 szint szignifikánsan csökkent idős korban, és korrelál az életkorral

A szérumban IGF-1 szintje szignifikánsan csökkent az idős vizsgálati résztvevőkben a fiatalokhoz képest. A vizsgált csoportokban nem figyeltünk meg nemi különbségeket a keringő IGF-1 szintjében. A szérumban IGF-1 szintje szignifikánsan korrelált az életkorral (10. ábra). A vizsgálatban résztvevők alapvető kardio-cerebrovaszkuláris rizikófaktorait vizsgálva azt találtuk, hogy az átlagos artériás vérnyomás szignifikánsan magasabb volt az idősebb résztvevőknél, mint a fiatal önkénteseknél, ugyanakkor a hipertónia betegség nem volt gyakoribb az idős résztvevők között. A fiatalok körében szignifikánsan gyakoribb volt a dohányzás.



10. ábra. A keringő IGF-1 szint szignifikánsan csökkent az idősebb vizsgálati résztvevőkben. **A:** A szérumban IGF-1 szintje (ng/ml) szignifikánsan csökkent idős (aged) résztvevőkben ($n = 32$) a fiatalokhoz (young) képest ($n = 31$) **** $p < 0,0001$ vs. Young. **B:** Nem figyeltünk meg nemi különbségeket a keringő IGF-1 szintjében (ng/ml) a vizsgált csoportokban ($n = 11$ nő és 20 férfi mind a fiatal, mind az idős csoportban). **C:** Korreláció a szérumban IGF-1 szint (ng/ml) és a résztvevők életkora (év) között.

A neurovaszkuláris kapcsolás csökkent az idős személyekben

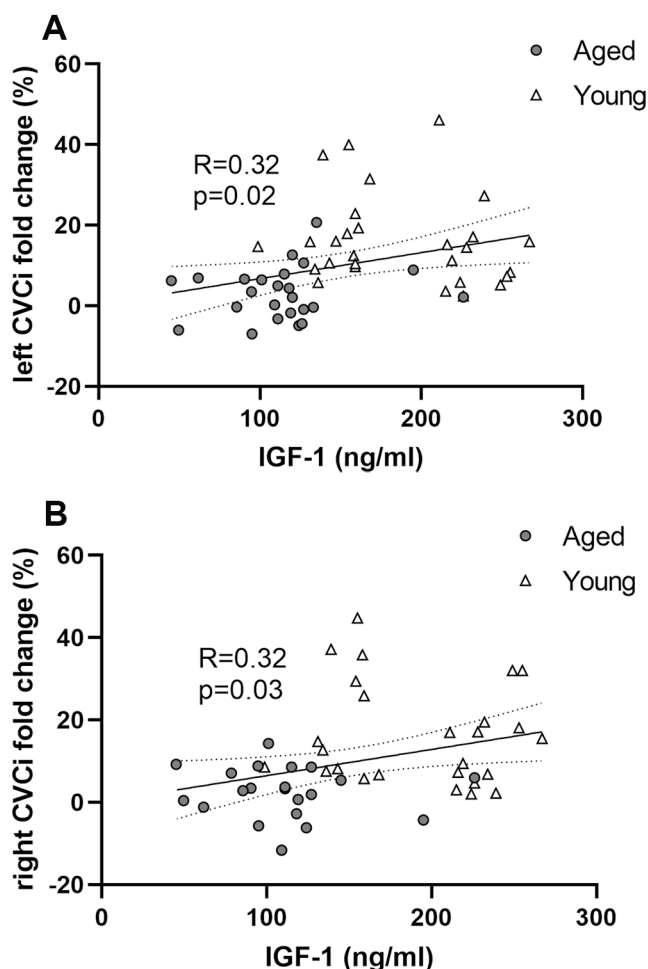
Az NVC-válaszokat a cerebrovaszkuláris konduktancia index (CVCi) változásával mértük a „trail making” teszt végzése közben. A CVCi szignifikánsan megemelkedett az alapszinthez képest mind a jobb, mind a bal oldali a. cerebri media-ban (MCA) mindkét csoportban, ugyan akkor az NVC válaszok szignifikánsan kisebbek voltak az idős vizsgálati személyekben a fiatal résztvevőkhöz képest. A légzésvisszatartási teszt mindkét korcsoportban szignifikáns CVCi-növekedést indukált, a különbség a két csoport között nem volt statisztikailag szignifikáns.

Az öregedés csökkenti a bazális agyi véráramlást, ami összefügg a szérumban IGF-1 szinttel

A jobb és bal oldali MCA-k átlagos keresztmetszete nem különbözött szignifikánsan a két csoport között, az átlagos áramlási sebesség mindkét MCA-ban szignifikánsan csökkent az idősebb alanyoknál a fiatalokhoz képest. A szérumban IGF-1 szintje szignifikánsan korrelált az MCA-kban mért bazális agyi véráramlással a fiatal és idős vizsgálati résztvevőkben.

Az életkorral csökkenő IGF-1 szint összefügg a neurovaszkuláris kapcsolás károsodásával

A szérumban IGF-1 szintje szignifikánsan korrelált a CVCi változásaival mindkét MCA-ban a „trail making” teszt alatt a vizsgálatban résztvevőknél. Ez azt jelzi, hogy a szérumban IGF-1 szintje korrelál az NVC válaszokkal (11. ábra).



11. ábra. Az életkorral csökkenő IGF-1 szint korrelál a neurovaszkuláris kapcsolás károsodásával. A–B: A szérumban IGF-1 szintje és az NVC válaszok közötti korreláció az agyi vaszkuláris konduktancia index [CVCi] százalékos változásában kifejezve a trail making teszt végzése közben, transcraniális Doppler-szonográfiával mérve a bal (A) és a jobb (B) arteria cerebri media-ban fiatal ($n = 31$) és idős ($n = 32$) vizsgálati résztvevőkben.

Megbeszélés

Vizsgálataink egyik legfontosabb eredménye, hogy korábbi preklinikai eredményeinkkel összhangban egészséges idős emberekből kimutattuk, hogy a neurovaszkuláris kapcsolás csökkent fiatal felnőttekhez képest. Az NVC károsodása mellett, eredményeink szerint az életkorral a bazális agyi véráramlás is csökken. Ennek hátterében a neurovaszkuláris egység életkorral kialakuló károsodása, a következményes, már többször említett endotheliális diszfunkció [204, 205], illetve az agyi kapilláris hálózat kor-függő sűrűség-csökkenése állhat [206-208].

Az itt bemutatott eredmények voltak az elsők, amelyek transzlációs bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a keringő IGF-1 szintjének életkorral összefüggő csökkenése hozzájárulhat az NVC-válaszok károsodásához idős emberekből, kiterjesztve a már bemutatott preklinikai eredményeket [184, 201-203]. Mint arról szó volt, az IGF-1 hiány sokrétű mechanizmuson keresztül károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást. Az IGF-1 hiány csökkenti az NVC válaszok endothélium-függő komponensét [201, 203] feltehetőleg fokozott oxidatív stressz okozásán keresztül [201, 203]. Emellett az IGF-1-hiány a neurovaszkuláris egység astrocytáiban [202] megváltoztatja az NVC-t mediáló arachidonsav származékok termelését, azok egyensúlyát a konstriktor mediátorok felé eltolva.

Összefoglalás

Összefoglalva, preklinikai eredményeinkből kiindulva kimutattuk, hogy idős egészséges emberekből a neurovaszkuláris kapcsolás csökkent, ami szignifikánsan korrelál az életkorral csökkenő szérumban IGF-1 szinttel. Bemutatott vizsgálatainknak fontos korlátai vannak. Eredményeink korrelatív jellegűek. Bár korábbi preklinikai vizsgálataink alapján feltehető az ok-okozati összefüggés a keringő IGF-1 hiány és az NVC válaszok károsodása között, a klinikai felmérésből az közvetlenül nem konkludálható. Az ok-okozatiság demonstrálása további bizonyítékokat igényel. Például érdekes lenne tesztelni, hogy a keringő IGF-1 szintet növelő kezelések (például GH-pótlás) hogyan befolyásolják az NVC-válaszokat idősebb felnőtteknél. Ugyan az általunk használt TCD protokoll megbízható módszer az NVC tanulmányozására kognitív feladatok során [162, 209-211], más módszerek (fNIRS, fMRI) jobb tér- és időbeli felbontással rendelkeznek. Ez alapján az NVC válaszok lehetséges regionális különbségeinek jelentősége és azok IGF-1 általi szabályozása további vizsgálatot igényel. Végül kísérleti egérmockokban úgy tűnik, hogy több, életkorral összefüggő mechanizmus szinergikusan rontja az NVC-válaszokat, ideértve a mitokondriális oxidatív stresszt [195], a NAD⁺ hiányt és a károsodott SIRT1 jelátvitelt [193, 212]. További vizsgálatokra van szükség ezen útvonalak és az életkorral összefüggő IGF-1-hiány közötti kölcsönhatás megértéséhez.

V. Új eredmények összefoglalása

Munkatársaimmal elsőként mutattuk ki, hogy:

- Fiatal hipertóniás egerek és patkányok agyi ereinek nyomás-indukálta myogén tónusa fokozódik, ami az érfali 20-HETE/TRPC6 konstriktor útvonal fokozott cerebrovaszkuláris expressziójának és működésének köszönhető. A magas nyomáshoz adaptálódott myogén mechanizmus megvédi a disztális keringési területeket a nagy nyomás- és volumenterheléstől.

- Öreg egerekben a fenti cerebrovaszkuláris adaptációs mechanizmus hiányzik, ennek köszönhetően a hipertónia által indukált vér-agy gát zavar fokozódik, pericyta vesztés, kapilláris pusztulás, neuroinflammáció és kognitív deficit alakul ki.

- Súlyos traumás agykárosodás szintén károsítja az agyi erek autoregulációs működését. A TBI után látott csökkent konstriktor válasz a fentiekkel szemben nem egy konstriktor útvonal csökkent működése miatt alakul ki, hanem a TBI-t követő excesszív mitokondriális hidrogén-peroxid termelés vezet a kalcium-függő kálium csatorna (BK_{Ca})-tranziens receptor potenciál csatorna 4 (TRPV4) dilatátor út túl-aktiválásához.

- Komorbid hipertónia jelenlétében egyetlen enyhe traumás agysérülés elegendő, hogy tartós, mitokondriális és NADPH oxidáz-eredetű oxidatív stresszt idézzen elő az agy artériáiban. Szintén demonstráltuk, hogy a tartósan fennálló oxidatív stressz megelőzhető SS-31 peptiddel történő kezeléssel, ezzel egy preklinikai modellt létrehozva a TBI-asszociált cerebrovaszkuláris oxidatív stressz hatékony csökkentésére, és káros következményeinek megelőzésére.

- Magasvérnyomás jelenléte esetén a TBI nem befolyásolja a citokróm P450 ω -hidroxiláz expressziót és a 20-HETE fokozott, nyomás-indukálta konstriktor hatását: a trauma nem tudja aktiválni a BK_{Ca}-TRPV4 vaszkuláris útvonalat.

- Állatmodellt hoztunk létre izolált, kísérletes neurovaszkuláris szét-kapcsolás vizsgálatára, aminek segítségével bemutattuk, hogy a neurovaszkuláris hiperémiás válasz csökkenése a kognitív funkció károsodásával jár.

- Resveratrol kezelés visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerek agyában, ami valószínűleg hozzájárul a magasabb kérgi funkciók javulásához. Ebben a NADPH-oxidáz eredetű oxidatív stressz hatékony csökkentése, és a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkció következményes javulása központi szerepet játszik.

- A szérum IGF1-hiány egerekben az öregedéshez hasonló funkcionális és fenotípusos változásokat okoz a cerebrovaszkuláris endothel sejtekben és astrocytáknban, ami által neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz, és kognitív károsodáshoz vezet. A neurovaszkuláris diszfunkció három IGF-1 hiányhoz köthető tényezőnek köszönhető: fokozott oxidatív stresszhez asszociált endothel diszfunkciónak, az astrocyták csökkent glutamát receptor expressziójának, valamint a glutamát által az astrocytáknban indukált csökkent dilatátor és fokozott konstriktor gliotranszmitter termelésnek.

- Preklinikai eredményeinkből kiindulva kimutattuk, hogy idős egészséges emberekben a neurovaszkuláris kapcsolás csökkent, ami szignifikánsan korrelál az életkorral csökkenő szérum IGF-1 szinttel.

VI. A doktori értekezés tézisei a következő publikációkra épülnek

Toth P, Tucsek Z, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Tarantini S, Koller A, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Age-related autoregulatory dysfunction and cerebromicrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *J Cereb Blood Flow Metab.* (33):1732–1742. 2013

D1, idézet: 170

Toth P, Csiszar A, Tucsek Z, Sosnowska D, Gautam T, Koller A, Schwartzman ML, Sonntag WE, Ungvari Z. Role of 20-HETE, TRPC channels and BK_{Ca} in dysregulation of pressure-induced calcium signaling and myogenic constriction of cerebral arteries in aged hypertensive mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305(12):H1698-708. 2013

Q1, idézet: 77

Toth P, Tarantini S, Tucsek Z, Ashpole N, Sosnowska D, Gautam T, Ballabh P, Koller A, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebromicrovascular endothelial function and down-regulation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 306(3):H299-308. 2014

Q1, idézet: 152

Toth P, Tarantini S, Ashpole NM, Tucsek Z, Milne GL, Valcarcel-Ares NM, Menyhart A, Farkas E, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. IGF-1 deficiency impairs neurovascular coupling in mice: implications for cerebromicrovascular aging. *Aging Cell.* 14(6):1034-44. 2015

D1, idézet: 113

Tarantini S, Hertelendy P, Tucsek Z, Valcarcel-Ares NM, Smith N, Menyhart A, Farkas E, Hodges E, Towner R, Deak F, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z, **Toth P**. Pharmacologically induced neurovascular un-coupling is associated with cognitive impairment in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 35(11):1871-81 2015

D1, idézet: 96

Szarka N, Amrein K, Horvath P, Ivic I, Czeiter E, Buki A, Koller A, **Toth P**. Hypertension-induced enhanced myogenic constriction of cerebral arteries is preserved after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 5;34(14):2315-2319. 2017

Q1, idézet: 10

Szarka N, Pabbidy MR, Amrein K, Czeiter E, Berta G, Pohoczky K, Helyes Z, Ungvari Z, Koller A, Buki A, **Toth P**. Traumatic brain injury impairs myogenic constriction of cerebral arteries: role of mitochondria-derived H₂O₂ and TRPV4-dependent activation of BK_{Ca} channels. *J Neurotrauma.* 35(7):930-939 2018

Q1, idézet: 40

Czigler A, Toth L, Szarka N, Berta G, Amrein K, Czeiter E, Lendvai-Emmert D, Bodo K, Tarantini S, Koller A, Ungvari Z, Buki A, **Toth P**. Hypertension exacerbates cerebrovascular oxidative stress induced by mild traumatic brain injury: protective effect of the mitochondria-targeted antioxidant peptide SS-31. *J Neurotrauma.* 36(23):3309-3315. 2019

Q1, idézet: 14

Toth L, Czigler A, Hegedus E, Komaromy H, Amrein K, Czeiter E, Yabluchanskiy A, Koller A, Orsi G, Perlaki G, Schwarcz A, Buki A, Ungvari Z, **Toth P**. Age-related decline in circulating IGF-1 associates with impaired neurovascular coupling responses in older adults. *Geroscience.* 44:2771-2783 2022

D1, idézet: 11

VII. Referenciák

1. Iadecola, C., *The pathobiology of vascular dementia*. Neuron, 2013. **80**(4): p. 844-66.
2. Tarantini, S., et al., *Pharmacologically-induced neurovascular uncoupling is associated with cognitive impairment in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015.
3. Iadecola, C., *The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(3): p. 287-96.
4. Wang, L., et al., *Chronic cerebral hypoperfusion induces memory deficits and facilitates Abeta generation in C57BL/6J mice*. Exp Neurol, 2016. **283**(Pt A): p. 353-364.
5. De Silva, T.M. and F.M. Faraci, *Microvascular Dysfunction and Cognitive Impairment*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(2): p. 241-58.
6. Lassen, N.A., *Autoregulation of Cerebral Blood Flow*. Circ Res, 1964. **15**: p. SUPPL:201-4.
7. Faraci, F.M., G.L. Baumbach, and D.D. Heistad, *Myogenic mechanisms in the cerebral circulation*. J Hypertens Suppl, 1989. **7**(4): p. S61-4; discussion S65.
8. Bohlen, H.G. and S.L. Harper, *Evidence of myogenic vascular control in the rat cerebral cortex*. Circ Res, 1984. **55**(4): p. 554-9.
9. Mellander, S., *Functional aspects of myogenic vascular control*. J Hypertens Suppl, 1989. **7**(4): p. S21-30; discussion S31.
10. Mueller, S.M., D.D. Heistad, and M.L. Marcus, *Total and regional cerebral blood flow during hypotension, hypertension, and hypocapnia. Effect of sympathetic denervation in dogs*. Circ Res, 1977. **41**(3): p. 350-6.
11. Vinall, P.E. and F.A. Simeone, *Cerebral autoregulation: an in vitro study*. Stroke, 1981. **12**(5): p. 640-2.
12. Brayden, J.E., et al., *Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(9): p. 1116-20.
13. Gebremedhin, D., et al., *Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 60-5.
14. Halpern, W. and G. Osol, *Influence of transmural pressure of myogenic responses of isolated cerebral arteries of the rat*. Ann Biomed Eng, 1985. **13**(3-4): p. 287-93.
15. Harder, D.R., J. Narayanan, and D. Gebremedhin, *Pressure-induced myogenic tone and role of 20-HETE in mediating autoregulation of cerebral blood flow*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1557-65.
16. Toth, P., et al., *Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(11): p. 1732-42.
17. Fog, M., *The Relationship between the Blood Pressure and the Tonic Regulation of the Pial Arteries*. Journal of neurology and psychiatry, 1938. **1**(3): p. 187-97.
18. Forbes, H.S., *Regulation of the cerebral vessels; new aspects*. A. M. A. archives of neurology and psychiatry, 1958. **80**(6): p. 689-95.
19. McHedlishvili, G., *Physiological mechanisms controlling cerebral blood flow*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1980. **11**(3): p. 240-8.
20. McHedlishvili, G.I., N.P. Mitagvaria, and L.G. Ormotsadze, *Vascular mechanisms controlling a constant blood supply to the brain ("autoregulation")*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1973. **4**(5): p. 742-50.
21. Aukes, A.M., et al., *Pregnancy prevents hypertensive remodeling and decreases myogenic reactivity in posterior cerebral arteries from Dahl salt-sensitive rats: a role in eclampsia?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H1071-6.
22. Cipolla, M.J., et al., *Increased Pressure-induced Tone in Rat Parenchymal Arterioles vs. Middle Cerebral Arteries: Role of Ion Channels and Calcium Sensitivity*. J Appl Physiol (1985), 2014.
23. Osol, G., I. Laher, and M. Cipolla, *Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation*. Circ Res, 1991. **68**(2): p. 359-67.
24. Cipolla, M.J., in *The Cerebral Circulation*. 2009: San Rafael (CA).
25. Toth, P., et al., *IGF-1 deficiency impairs cerebral myogenic autoregulation in hypertensive mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(12): p. 1887-1897.
26. Mayhan, W.G., A.H. Werber, and D.D. Heistad, *Protection of cerebral vessels by sympathetic nerves and vascular hypertrophy*. Circulation, 1987. **75**(1 Pt 2): p. I107-12.
27. Werber, A.H. and D.D. Heistad, *Effects of chronic hypertension and sympathetic nerves on the cerebral microvasculature of stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 1984. **55**(3): p. 286-94.
28. Faraco, G. and C. Iadecola, *Hypertension: a harbinger of stroke and dementia*. Hypertension, 2013. **62**(5): p. 810-7.

29. Gokina, N.I., et al., *Increased Ca²⁺ sensitivity as a key mechanism of PKC-induced constriction in pressurized cerebral arteries*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. H1178-88.
30. Knot, H.J. and M.T. Nelson, *Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 2): p. H348-55.
31. Knot, H.J. and M.T. Nelson, *Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure*. J Physiol (Lond), 1998. **508**(Pt 1): p. 199-209.
32. Knot, H.J., N.B. Standen, and M.T. Nelson, *Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat via Ca²⁺-dependent K⁺ channels*. J Physiol (Lond), 1998. **508**(Pt 1): p. 211-21.
33. Welsh, D.G., et al., *Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 248-50.
34. Fan, F., et al., *Impaired myogenic response and autoregulation of cerebral blood flow is rescued in CYP4A1 transgenic Dahl salt-sensitive rat*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015. **308**(5): p. R379-90.
35. Ge, Y., et al., *Role of 20-HETE in the impaired myogenic and TGF responses of the Af-Art of Dahl salt-sensitive rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(5): p. F509-15.
36. Liu, X., et al., *Epoxyeicosatrienoic acid-dependent cerebral vasodilation evoked by metabotropic glutamate receptor activation in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(2): p. H373-81.
37. Reading, S.A. and J.E. Brayden, *Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation*. Stroke, 2007. **38**(8): p. 2322-8.
38. Nelson, M.T., et al., *Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries*. The Journal of physiology, 1997. **502** (Pt 2): p. 259-64.
39. D'Angelo, G., et al., *Integrin-mediated reduction in vascular smooth muscle [Ca²⁺]i induced by RGD-containing peptide*. The American journal of physiology, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H2065-70.
40. Cipolla, M.J., N.I. Gokina, and G. Osol, *Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior*. Faseb J, 2002. **16**(1): p. 72-6.
41. Brayden, J.E., et al., *Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow*. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2008. **35**(9): p. 1116-20.
42. Schubert, R., D. Lidington, and S.S. Bolz, *The emerging role of Ca²⁺ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction*. Cardiovascular research, 2008. **77**(1): p. 8-18.
43. Schubert, R. and M.J. Mulvany, *The myogenic response: established facts and attractive hypotheses*. Clinical science, 1999. **96**(4): p. 313-26.
44. Mathiesen, C., et al., *Modification of activity-dependent increases of cerebral blood flow by excitatory synaptic activity and spikes in rat cerebellar cortex*. J Physiol, 1998. **512** (Pt 2): p. 555-66.
45. Enager, P., et al., *Pathway-specific variations in neurovascular and neurometabolic coupling in rat primary somatosensory cortex*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(5): p. 976-86.
46. Attwell, D., et al., *Glial and neuronal control of brain blood flow*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 232-43.
47. Busija, D.W., et al., *Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-D-aspartate in cerebral cortex*. Brain Res Rev, 2007. **56**(1): p. 89-100.
48. Ma, J., et al., *Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression*. Am J Physiol, 1996. **270**(3 Pt 2): p. H1085-90.
49. Cauli, B. and E. Hamel, *Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling*. Front Neuroenergetics, 2010. **2**: p. 9.
50. Porter, J.T. and K.D. McCarthy, *Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals*. J Neurosci, 1996. **16**(16): p. 5073-81.
51. Stobart, J.L., et al., *Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 3149-54.
52. Fernandes, J., et al., *IP₃ sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid*. J Cell Biol, 2008. **181**(1): p. 143-55.
53. Nilius, B., H. Watanabe, and J. Vriens, *The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour*. Pflugers Arch, 2003. **446**(3): p. 298-303.
54. Zhang, F., S. Xu, and C. Iadecola, *Role of nitric oxide and acetylcholine in neocortical hyperemia elicited by basal forebrain stimulation: evidence for an involvement of endothelial nitric oxide*. Neuroscience, 1995. **69**(4): p. 1195-204.
55. Girouard, H., et al., *Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 303-9.
56. Toth, P., et al., *Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebrovascular endothelial function and down-regulation of NADPH oxidase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013.

57. Paulson, O.B. and E.A. Newman, *Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?* Science, 1987. **237**(4817): p. 896-8.
58. Witthoft, A., J.A. Filosa, and G.E. Karniadakis, *Potassium buffering in the neurovascular unit: models and sensitivity analysis.* Biophys J, 2013. **105**(9): p. 2046-54.
59. Ivanov, A.I., et al., *Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices.* J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(3): p. 397-407.
60. Paulson, O.B., et al., *Cerebral blood flow response to functional activation.* J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(1): p. 2-14.
61. Zaletel, M., et al., *Age-related changes in the relationship between visual evoked potentials and visually evoked cerebral blood flow velocity response.* Funct Neurol, 2005. **20**(3): p. 115-20.
62. Topcuoglu, M.A., H. Aydin, and E. Saka, *Occipital cortex activation studied with simultaneous recordings of functional transcranial Doppler ultrasound (fTCD) and visual evoked potential (VEP) in cognitively normal human subjects: effect of healthy aging.* Neurosci Lett, 2009. **452**(1): p. 17-22.
63. Stefanova, I., et al., *Age-related changes of blood-oxygen-level-dependent signal dynamics during optokinetic stimulation.* Neurobiol Aging, 2013. **34**(10): p. 2277-86.
64. Fabiani, M., et al., *Neurovascular coupling in normal aging: A combined optical, ERP and fMRI study.* Neuroimage, 2013.
65. Aronow, W.S., et al., *ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents.* Circulation, 2011. **123**(21): p. 2434-506.
66. Iadecola, C., L. Park, and C. Capone, *Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension.* Stroke, 2009. **40**(3 Suppl): p. S40-4.
67. Gorelick, P.B., et al., *Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association.* Stroke, 2011. **42**(9): p. 2672-2713.
68. Brickman, A.M., et al., *Long-term blood pressure fluctuation and cerebrovascular disease in an elderly cohort.* Archives of neurology, 2010. **67**(5): p. 564-9.
69. Reitz, C., et al., *Hypertension and the risk of mild cognitive impairment.* Archives of neurology, 2007. **64**(12): p. 1734-40.
70. Kuller, L.H., et al., *Determinants of vascular dementia in the Cardiovascular Health Cognition Study.* Neurology, 2005. **64**(9): p. 1548-52.
71. Paulson, O.B., S. Strandgaard, and L. Edvinsson, *Cerebral autoregulation.* Cerebrovascular and brain metabolism reviews, 1990. **2**(2): p. 161-92.
72. Strandgaard, S., et al., *Upper limit of cerebral blood flow autoregulation in experimental renovascular hypertension in the baboon.* Circulation research, 1975. **37**(2): p. 164-7.
73. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure.* Circulation research, 1990. **66**(1): p. 8-17.
74. Kontos, H.A., et al., *Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension.* Am J Physiol, 1978. **234**(4): p. H371-83.
75. Harper, S.L. and H.G. Bohlen, *Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats.* Hypertension, 1984. **6**(3): p. 408-19.
76. Osol, G. and W. Halpern, *Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats.* Am J Physiol, 1985. **249**(5 Pt 2): p. H914-21.
77. New, D.I., et al., *Cerebral artery responses to pressure and flow in uremic hypertensive and spontaneously hypertensive rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(4): p. H1212-6.
78. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.* Neuron, 2008. **57**(2): p. 178-201.
79. Fernandez-Vizarra, P., et al., *Immunoglobulin G Fc receptor deficiency prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment in mice.* Brain, 2012. **135**(Pt 9): p. 2826-37.
80. Gao, H.M., et al., *Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003. **17**(13): p. 1954-6.
81. Kaneko, Y.S., et al., *Microglial activation in neuroinflammation: implications for the etiology of neurodegeneration.* Neurodegener Dis, 2012. **10**(1-4): p. 100-3.
82. Roozendaal, B., A.I. Maas, and D.K. Menon, *Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury.* Nat Rev Neurol, 2013. **9**(4): p. 231-6.
83. Langlois, J.A. and R.W. Sattin, *Traumatic brain injury in the United States: research and programs of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC).* J Head Trauma Rehabil, 2005. **20**(3): p. 187-8.
84. Tagliaferri, F., et al., *A systematic review of brain injury epidemiology in Europe.* Acta Neurochir (Wien), 2006. **148**(3): p. 255-68; discussion 268.

85. Overgaard, J. and W.A. Tweed, *Cerebral circulation after head injury. 1. Cerebral blood flow and its regulation after closed head injury with emphasis on clinical correlations.* J Neurosurg, 1974. **41**(5): p. 531-41.
86. Enevoldsen, E.M. and F.T. Jensen, *"False" autoregulation of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury.* Acta Neurol Scand Suppl, 1977. **64**: p. 514-5.
87. Enevoldsen, E.M. and F.T. Jensen, *Autoregulation and CO₂ responses of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury.* J Neurosurg, 1978. **48**(5): p. 689-703.
88. Cold, G.E. and F.T. Jensen, *Cerebral autoregulation in unconscious patients with brain injury.* Acta Anaesthesiol Scand, 1978. **22**(3): p. 270-80.
89. Muizelaar, J.P., H.A. Lutz, 3rd, and D.P. Becker, *Effect of mannitol on ICP and CBF and correlation with pressure autoregulation in severely head-injured patients.* J Neurosurg, 1984. **61**(4): p. 700-6.
90. Muizelaar, J.P., et al., *Cerebral blood flow and metabolism in severely head-injured children. Part 2: Autoregulation.* J Neurosurg, 1989. **71**(1): p. 72-6.
91. Newell, D.W., et al., *Evaluation of hemodynamic responses in head injury patients with transcranial Doppler monitoring.* Acta Neurochir (Wien), 1997. **139**(9): p. 804-17.
92. Czosnyka, M., et al., *Cerebral autoregulation following head injury.* J Neurosurg, 2001. **95**(5): p. 756-63.
93. Czosnyka, M., et al., *Monitoring of cerebral autoregulation in head-injured patients.* Stroke, 1996. **27**(10): p. 1829-34.
94. Junger, E.C., et al., *Cerebral autoregulation following minor head injury.* J Neurosurg, 1997. **86**(3): p. 425-32.
95. Engelborghs, K., et al., *Impaired autoregulation of cerebral blood flow in an experimental model of traumatic brain injury.* J Neurotrauma, 2000. **17**(8): p. 667-77.
96. DeWitt, D.S., et al., *Regional cerebrovascular responses to progressive hypotension after traumatic brain injury in cats.* Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1276-84.
97. Lewelt, W., L.W. Jenkins, and J.D. Miller, *Autoregulation of cerebral blood flow after experimental fluid percussion injury of the brain.* J Neurosurg, 1980. **53**(4): p. 500-11.
98. Budohoski, K.P., et al., *Monitoring cerebral autoregulation after head injury. Which component of transcranial Doppler flow velocity is optimal?* Neurocrit Care, 2012. **17**(2): p. 211-8.
99. Budohoski, K.P., et al., *The relationship between cerebral blood flow autoregulation and cerebrovascular pressure reactivity after traumatic brain injury.* Neurosurgery, 2012. **71**(3): p. 652-60; discussion 660-1.
100. Modrick, M.L., et al., *Role of hydrogen peroxide and the impact of glutathione peroxidase-1 in regulation of cerebral vascular tone.* J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(6): p. 1130-7.
101. Knot, H.J. and M.T. Nelson, *Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries.* The American journal of physiology, 1995. **269**(1 Pt 2): p. H348-55.
102. Brayden, J.E. and M.T. Nelson, *Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels.* Science, 1992. **256**(5056): p. 532-5.
103. Paterno, R., D.D. Heistad, and F.M. Faraci, *Potassium channels modulate cerebral autoregulation during acute hypertension.* American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2000. **278**(6): p. H2003-7.
104. Randhawa, P.K. and A.S. Jaggi, *TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system.* Basic Res Cardiol, 2015. **110**(6): p. 54.
105. Hayabuchi, Y., et al., *Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels.* Heart Vessels, 1998. **13**(1): p. 9-17.
106. Iida, Y. and Z.S. Katusic, *Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide.* Stroke, 2000. **31**(9): p. 2224-30.
107. Kontos, H.A. and E.P. Wei, *Superoxide production in experimental brain injury.* J Neurosurg, 1986. **64**(5): p. 803-7.
108. Kasemsri, T. and W.M. Armstead, *Endothelin production links superoxide generation to altered opioid-induced pial artery vasodilation after brain injury in pigs.* Stroke, 1997. **28**(1): p. 190-6; discussion 197.
109. Springo, Z., et al., *Aging Exacerbates Pressure-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Mouse Cerebral Arteries.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(11): p. 1355-9.
110. Wang, F., et al., *Mechanical stretch exacerbates the cell death in SH-SY5Y cells exposed to paraquat: mitochondrial dysfunction and oxidative stress.* Neurotoxicology, 2014. **41**: p. 54-63.
111. Kim, J.J., et al., *Phlorofucofuroeckol Improves Glutamate-Induced Neurotoxicity through Modulation of Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction in PC12 Cells.* PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163433.

112. Manucha, W., *Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity*. Clin Investig Arterioscler, 2016.
113. Cao, Y., et al., *Glutamate carboxypeptidase II gene knockout attenuates oxidative stress and cortical apoptosis after traumatic brain injury*. BMC Neurosci, 2016. **17**: p. 15.
114. Case, A.J., et al., *Mitochondrial-localized NADPH oxidase 4 is a source of superoxide in angiotensin II-stimulated neurons*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(1): p. H19-28.
115. Zimmerman, M.C., et al., *Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system*. Circ Res, 2002. **91**(11): p. 1038-45.
116. Lopez-Fabuel, I., et al., *Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(46): p. 13063-13068.
117. Drose, S., A. Stepanova, and A. Galkin, *Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1857**(7): p. 946-57.
118. Gidday, J.M., J.W. Beetsch, and T.S. Park, *Endogenous glutathione protects cerebral endothelial cells from traumatic injury*. J Neurotrauma, 1999. **16**(1): p. 27-36.
119. Lifshitz, J., et al., *Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury*. Mitochondrion, 2004. **4**(5-6): p. 705-13.
120. Mendes Arent, A., et al., *Perspectives on molecular biomarkers of oxidative stress and antioxidant strategies in traumatic brain injury*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 723060.
121. Wang, J.N., N. Shi, and S.Y. Chen, *Manganese superoxide dismutase inhibits neointima formation through attenuation of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 173-81.
122. Earley, S., et al., *TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1270-9.
123. Kumar, R.G., et al., *Epidemiology of Comorbid Conditions Among Adults 50 Years and Older With Traumatic Brain Injury*. J Head Trauma Rehabil, 2018. **33**(1): p. 15-24.
124. Centers for Disease Control and Prevention. *Report to Congress on Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation*.
2015. Atlanta, GA: National Center for Injury Prevention and Control; Division of Unintentional Injury Prevention, 2015.
125. Thompson, H.J., S. Dikmen, and N. Temkin, *Prevalence of comorbidity and its association with traumatic brain injury and outcomes in older adults*. Res Gerontol Nurs, 2012. **5**(1): p. 17-24.
126. Lu, Y.C., et al., *Inhibition of nitric oxide synthase potentiates hypertension and increases mortality in traumatically brain-injured rats*. Mol Chem Neuropathol, 1997. **30**(1-2): p. 125-37.
127. Marcano, D.C., et al., *Design of poly(ethylene glycol)-functionalized hydrophilic carbon clusters for targeted therapy of cerebrovascular dysfunction in mild traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2013. **30**(9): p. 789-96.
128. Fehily, B. and M. Fitzgerald, *Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage*. Cell Transplant, 2017. **26**(7): p. 1131-1155.
129. Pinto, C.C., et al., *Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy*. Free Radic Res, 2007. **41**(10): p. 1151-8.
130. Springo, Z., et al., *Aging Exacerbates Pressure-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Mouse Cerebral Arteries*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015.
131. Tarantini, S., et al., *Treatment with the mitochondrial-targeted antioxidant peptide SS-31 rescues neurovascular coupling responses and cerebrovascular endothelial function and improves cognition in aged mice*. Aging Cell, 2018. **17**(2).
132. Toth, P., et al., *Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(3): p. H299-308.
133. Hortobagyi, L., et al., *Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent of vasodilator prostanoids*. Brain Res, 2007. **1131**(1): p. 129-37.
134. Park, L., et al., *NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide*. J Neurosci, 2005. **25**(7): p. 1769-77.
135. Touyz, R.M. and A.C. Montezano, *Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase*. Circ Res, 2012. **110**(9): p. 1159-61.
136. Dai, D.F., et al., *Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(1): p. 73-82.
137. Ma, M.W., et al., *Deletion of NADPH oxidase 4 reduces severity of traumatic brain injury*. Free Radic Biol Med, 2018. **117**: p. 66-75.
138. Ma, M.W., et al., *NADPH oxidases in traumatic brain injury - Promising therapeutic targets?* Redox Biol, 2018. **16**: p. 285-293.

139. Chandran, R., et al., *A combination antioxidant therapy to inhibit NOX2 and activate Nrf2 decreases secondary brain damage and improves functional recovery after traumatic brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2018. **38**(10): p. 1818-1827.
140. Coronado, V.G., et al., *The CDC traumatic brain injury surveillance system: characteristics of persons aged 65 years and older hospitalized with a TBI*. J Head Trauma Rehabil, 2005. **20**(3): p. 215-28.
141. Krishnamoorthy, V., et al., *Demographic and clinical risk factors associated with hospital mortality after isolated severe traumatic brain injury: a cohort study*. J Intensive Care, 2015. **3**: p. 46.
142. Krishnamoorthy, V., et al., *Hypertension After Severe Traumatic Brain Injury: Friend or Foe?* J Neurosurg Anesthesiol, 2016.
143. Sellmann, T., et al., *The impact of arterial hypertension on polytrauma and traumatic brain injury*. Dtsch Arztebl Int, 2012. **109**(49): p. 849-56.
144. Kamal, V.K., D. Agrawal, and R.M. Pandey, *Prognostic models for prediction of outcomes after traumatic brain injury based on patients admission characteristics*. Brain Inj, 2016: p. 1-14.
145. Toth, P., et al., *Treatment with the cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2013. **168**(8): p. 1878-88.
146. Toth, P., et al., *Role of 20-HETE, TRP channels & BKCa in dysregulation of pressure-induced Ca²⁺ signaling and myogenic constriction of cerebral arteries in aged hypertensive mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013.
147. Zou, A.P., et al., *20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in renal arterioles*. Am J Physiol, 1996. **270**(1 Pt 2): p. R228-37.
148. Zlokovic, B.V., *Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(12): p. 723-38.
149. Chen, B.R., et al., *A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(3): p. e000787.
150. Peng, X., et al., *Suppression of cortical functional hyperemia to vibrissal stimulation in the rat by epoxygenase inhibitors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H2029-37.
151. Takano, T., et al., *Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 260-7.
152. Zonta, M., et al., *Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 43-50.
153. Tucsek, Z., et al., *Obesity in Aging Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus: Effects on Expression of Genes Involved in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer's Disease*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013.
154. Kazama, K., et al., *Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals*. Circ Res, 2004. **95**(10): p. 1019-26.
155. Girouard, H. and C. Iadecola, *Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease*. J Appl Physiol, 2006. **100**(1): p. 328-35.
156. Heinzl, S., et al., *A neurodegenerative vascular burden index and the impact on cognition*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 161.
157. Gorelick, P.B., et al., *Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association*. Stroke, 2011. **42**(9): p. 2672-713.
158. Miralbell, J., et al., *Cognitive patterns in relation to biomarkers of cerebrovascular disease and vascular risk factors*. Cerebrovasc Dis, 2013. **36**(2): p. 98-105.
159. Bruhn, H., P. Fransson, and J. Frahm, *Modulation of cerebral blood oxygenation by indomethacin: MRI at rest and functional brain activation*. J Magn Reson Imaging, 2001. **13**(3): p. 325-34.
160. Szabo, K., et al., *Effect of non-steroid anti-inflammatory drugs on neurovascular coupling in humans*. J Neurol Sci, 2014. **336**(1-2): p. 227-31.
161. Sorond, F.A., et al., *Neurovascular coupling, cerebral white matter integrity, and response to cocoa in older people*. Neurology, 2013.
162. Sorond, F.A., et al., *Neurovascular coupling is impaired in slow walkers: the MOBILIZE Boston Study*. Ann Neurol, 2011. **70**(2): p. 213-20.
163. Park, L., et al., *Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(12): p. 1908-18.
164. Ungvari, Z.I., et al., *Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H37-47.
165. Pearson, K.J., et al., *Resveratrol Delays Age-Related Deterioration and Mimics Transcriptional Aspects of Dietary Restriction without Extending Life Span*. Cell Metab, 2008. **8**(2): p. 157-68.

166. Zhang, H., et al., *Resveratrol improves endothelial function: role of TNF α and vascular oxidative stress*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(8): p. 1164-71.
167. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(1): p. H18-24.
168. Ungvari, Z.I., et al., *Adaptive induction of NF-E2-Related Factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(4): p. H1133-40.
169. Rakici, O., et al., *Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery*. *Int J Cardiol*, 2005. **105**(2): p. 209-15.
170. Zhang, H., et al., *Resveratrol Improves Left Ventricular Diastolic Relaxation in Type 2 Diabetes by Inhibiting Oxidative/Nitrative Stress*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(4): p. H985-94.
171. Zarzuelo, M.J., et al., *SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(9): p. 1288-96.
172. Bruce-Keller, A.J., et al., *NOX activity in brain aging: exacerbation by high fat diet*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(1): p. 22-30.
173. Morrison, C.D., et al., *High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling*. *J Neurochem*, 2010. **114**(6): p. 1581-9.
174. Zhao, Y.N., et al., *Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **435**(4): p. 597-602.
175. Oomen, C.A., et al., *Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice*. *Front Aging Neurosci*, 2009. **1**: p. 4.
176. Liu, G.S., et al., *Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice*. *Life Sci*, 2012. **91**(17-18): p. 872-7.
177. Baur, J.A., et al., *Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan?* *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(6): p. 443-61.
178. Kennedy, D.O., et al., *Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation*. *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**(6): p. 1590-7.
179. Ogle, W.O., R.B. Speisman, and B.K. Ormerod, *Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: a mini-review*. *Gerontology*, 2013. **59**(1): p. 23-31.
180. Longden, T. and M. Nelson, *Recruitment of the Vascular Endothelium into Neurovascular Coupling*. *Proceedings of the British Pharmacological Society at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol9Issue3abst062P.pdf>*, 2011. **9**(3): p. 062P.
181. Csiszar, A., et al., *Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function*. *Circ Res*, 2002. **90**(11): p. 1159-66.
182. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. *Physiological reviews*, 2007. **87**(1): p. 315-424.
183. Sonntag, W.E., et al., *Insulin-like growth factor-1 in CNS and cerebrovascular aging*. *Front Aging Neurosci*, 2013. **5**: p. 27.
184. Ungvari, Z. and A. Csiszar, *The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012. **67**(6): p. 599-610.
185. Berenbaum, F., et al., *Insulin-like growth factors counteract the effect of interleukin 1 beta on type II phospholipase A2 expression and arachidonic acid release by rabbit articular chondrocytes*. *FEBS Lett*, 1994. **340**(1-2): p. 51-5.
186. Damke, H., H. Bouterfa, and T. Braulke, *Effects of insulin-like growth factor II on the generation of inositol trisphosphate, diacylglycerol and cAMP in human fibroblasts*. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **99**(2): p. R25-9.
187. Tahara, K., et al., *Regulation of prostaglandin synthesis by thyrotropin, insulin or insulin-like growth factor-I, and serum in FRTL-5 rat thyroid cells*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(1): p. 440-8.
188. Sharma, H.S., et al., *Topical application of insulin like growth factor-1 reduces edema and upregulation of neuronal nitric oxide synthase following trauma to the rat spinal cord*. *Acta Neurochir Suppl*, 1997. **70**: p. 130-3.
189. Toth, P., et al., *Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebromicrovascular endothelial function and down-regulation of NADPH oxidase*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(3): p. H299-308.
190. Csiszar, A., et al., *Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(5): p. H1882-94.
191. Petzold, G.C. and V.N. Murthy, *Role of astrocytes in neurovascular coupling*. *Neuron*, 2011. **71**(5): p. 782-97.

192. Tarantini, S., et al., *Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline*. *Exp Gerontol*, 2017. **94**: p. 52-58.
193. Tarantini, S., et al., *Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation rescues cerebrovascular endothelial function and neurovascular coupling responses and improves cognitive function in aged mice*. *Redox Biol*, 2019. **24**: p. 101192.
194. Tarantini, S., et al., *Treatment with the BCL-2/BCL-xL inhibitor senolytic drug ABT263/Navitoclax improves functional hyperemia in aged mice*. *Geroscience*, 2021. **43**: p. 2427-2440.
195. Csiszar, A., et al., *Overexpression of catalase targeted to mitochondria improves neurovascular coupling responses in aged mice*. *Geroscience*, 2019. **41**(5): p. 609-617.
196. Sonntag, W.E., M. Ramsey, and C.S. Carter, *Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging*. *Ageing Res Rev*, 2005. **4**(2): p. 195-212.
197. O'Connor, K.G., et al., *Serum levels of insulin-like growth factor-I are related to age and not to body composition in healthy women and men*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1998. **53**(3): p. M176-82.
198. Pavlov, E.P., et al., *Responses of growth hormone (GH) and somatomedin-C to GH-releasing hormone in healthy aging men*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. **62**(3): p. 595-600.
199. Ameri, P., et al., *Vitamin D modulates the association of circulating insulin-like growth factor-1 with carotid artery intima-media thickness*. *Atherosclerosis*, 2014. **236**(2): p. 418-25.
200. Sherlala, R.A., et al., *Relationship between Serum IGF-1 and BMI differs by Age*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2020.
201. Toth, P., et al., *IGF-1 deficiency impairs neurovascular coupling in mice: implications for cerebrovascular aging*. *Aging Cell*, 2015. **14**(6): p. 1034-44.
202. Tarantini, S., et al., *IGF1R signaling regulates astrocyte-mediated neurovascular coupling in mice: implications for brain aging*. *Geroscience*, 2021. **43**(2): p. 901-911.
203. Tarantini, S., et al., *Endothelial deficiency of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) impairs neurovascular coupling responses in mice, mimicking aspects of the brain aging phenotype*. *Geroscience*, 2021.
204. Mokhber, N., et al., *Cerebral blood flow changes during aging process and in cognitive disorders: A review*. *Neuroradiol J*, 2021. **34**(4): p. 300-307.
205. Demirkaya, S., et al., *Normal blood flow velocities of basal cerebral arteries decrease with advancing age: a transcranial Doppler sonography study*. *Tohoku J Exp Med*, 2008. **214**(2): p. 145-9.
206. Ungvari, Z., et al., *Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature*. *Nat Rev Cardiol*, 2018. **15**(9): p. 555-565.
207. Nyul-Toth, A., et al., *Demonstration of age-related blood-brain barrier disruption and cerebrovascular rarefaction in mice by longitudinal intravital two-photon microscopy and optical coherence tomography*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021. **320**(4): p. H1370-H1392.
208. Tucsek, Z., et al., *Aging exacerbates obesity-induced cerebrovascular rarefaction, neurovascular uncoupling, and cognitive decline in mice*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014. **69**(11): p. 1339-52.
209. Csipo, T., et al., *Increased cognitive workload evokes greater neurovascular coupling responses in healthy young adults*. *PLoS One*, 2021. **16**(5): p. e0250043.
210. Jor'dan, A.J., et al., *Diminished Locomotor Control Is Associated With Reduced Neurovascular Coupling in Older Adults*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2020. **75**(8): p. 1516-1522.
211. Sorond, F.A., et al., *Cerebral blood flow regulation during cognitive tasks: effects of healthy aging*. *Cortex*, 2008. **44**(2): p. 179-84.
212. Csiszar, A., et al., *Role of endothelial NAD⁺ deficiency in age-related vascular dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019. **316**(6): p. H1253-H1266.