

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**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 bizik 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 Kórélettani Intézetében és Idegsebészeti Klinikáján, hogy munkámban támogattak és abban részt vettek, segítettek. Klinikai, sebészi munkámban külön köszönöm Dr. Kuncz Ádám, Dr. Horváth Zsolt és Dr. Kolumbán Bálint segítségét. Köszönöm PhD hallgatóimnak a közös munkát, nagyon sokat tanultam tőlük. Hálás vagyok TDK témavezetőmnek, Dr. Degrell Péternek, aki az aprólékos munka fontosságára tanított. Fontos megemlítenem alma materemet, a veszprémi Lovassy László Gimnáziumot; különösen hálás vagyok Szelényi Gézané biológia és Tölgyes Józsefné kémia tanárainknak, 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, Flóranak és Fanninak, hogy szeretetükkel, odaadásukkal és mosolyukkal bevilágítják az életemet.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
I. Bevezetés	6
<i>I.1. Az agyi véráramlás autoregulációja: az agyi erek nyomás-indukálta myogén válaszána</i> <i>szerepe</i>	6
1.1.1. Az agyi erek myogén válaszána	9
1.1.2. A nyomás-indukálta myogén válasz celluláris mechanizmusai	10
<i>I.2. A neurovaszkuláris kapcsolás és celluláris mechanizmusai: aktív agyi területek vérellátása</i>	11
II. Célkitűzések	14
III. Az agyi véráramlás autoregulációjának károsodása különböző kórképekben: a konstriktor és dilatátor mechanizmusok egyensúlyának kóros megbombolása	15
<i>III.1. Agyi autoregulációs diszfunkció hipertóniában és öregedésben: mechanizmus és következmények</i>	15
<i>III.2. Agyi erek myogén autoregulációs működésének károsodása súlyos koponya-agy sérülés után</i>	25
<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>	34
<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>	38
IV. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása: preklinikai modellektől az emberig	40
<i>IV.1. A neurovaszkuláris kapcsolás szerepe a kognitív funkcióban</i>	41
<i>IV.2. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása öregedésben: a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szerepe és annak farmakológiai csökkentése</i>	49
<i>IV.3. Az inzulinszerű növekedési faktor hiánya neurovaszkuláris szét-kapcsolást okoz</i>	57
<i>IV.4. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idős emberekben: az inzulinszerű növekedési faktor szerepe</i>	66
V. Új eredmények összefoglalása	71
VI. Módszerek	73
<i>VI.1. Agyi autoregulációs diszfunkció hipertóniában és öregedésben: mechanizmus és következmények</i>	73
<i>VI.2. Agyi erek myogén autoregulációs működésének károsodása súlyos koponya-agy sérülés után</i>	80
<i>VI.3. Az enyhe koponya-agy sérülés fokozza a hipertónia által indukált cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stresszt – a TBI-indukálta szabadgyök képződés hatékony csökkentése</i>	83
<i>VI.4. A nyomás-indukált cerebrovaszkuláris konstriktor és dilatátor útvonalak közötti interakció: agyi erek autoregulációs működése súlyos koponya trauma után egyidejű magasvérnyomás betegség jelenlétében</i> ..	84
<i>VI.5. A neurovaszkuláris kapcsolás szerepe a kognitív funkcióban</i>	85
<i>VI.6. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása öregedésben: a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szerepe és annak farmakológiai csökkentése</i>	92

<i>VI.7. Az inzulinszerű növekedési faktor hiánya neurovaszkuláris szét-kapcsolást okoz</i>	<i>94</i>
<i>VI.8. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idős emberekben: az inzulinszerű növekedési faktor szerepe</i>	<i>98</i>
VII. A doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk	101
VIII. Referenciák	102

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

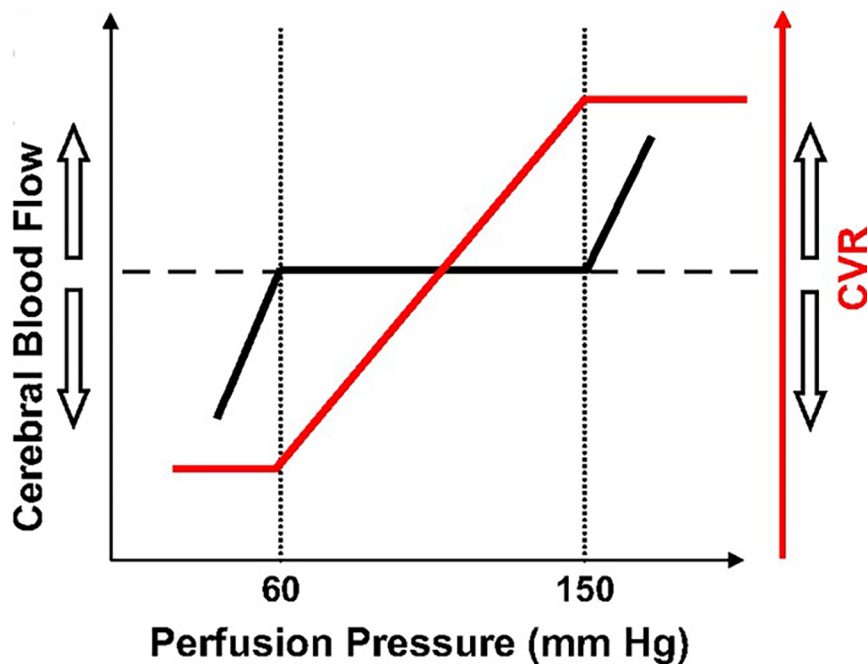
A megfelelő szöveti perfúzió biztosítása az agyi érhálózaton keresztül létfontosságú a normális neuronális működés megőrzéséhez [5-9]. Az agyi véráramlás (cerebral blood flow-CBF) szabályozásának egyedi körülmények között kell biztosítani a megfelelő tápanyag- és oxigénszállítást, elkerülve az agy hipoperfúzióját 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 mikrovaszkuláris 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 értekezés alapját adja. Élettani, kórélettani, molekuláris biológiai és klinikai vizsgálatainkat olyan betegségekben szenvedő embereken 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 visszacsatolás alapján 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 mikrovaszkuláris nyomás) jön létre [2] (1. ábra).



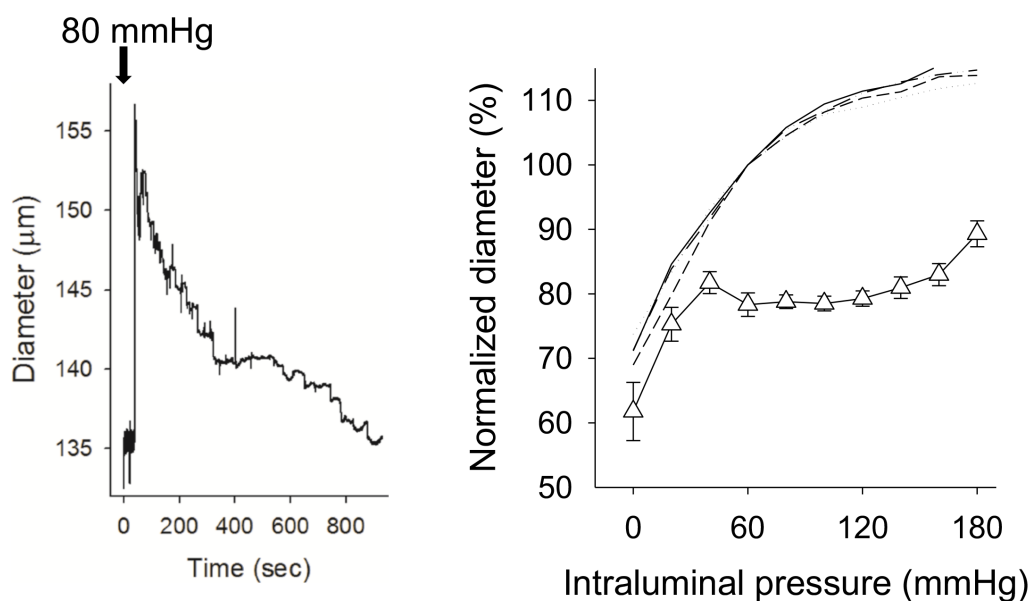
1. ábra. Az agyi véráramlás statikus autoregulációs működésének sémája Lassen szerint.

Az artériás középnyomás és az intracraniális nyomás különbségeként kiszámolható agyi perfúziós nyomás (perfusion pressure) tartja fenn az agyszövet véráramlását (cerebral blood flow). Az eredetileg Niels Lassen által proponált modell [1-3] szerint a perfúziós nyomás változásainak ellenére az autoregulációs működésnek köszönhetően a CBF nem változik lényegesen. Ez, negatív visszacsatolással, az autoregulációs mechanizmusok által a nyomás-változáshoz illesztett agyi vaszkuláris rezisztencia-változásnak (CVR) köszönhető. Ugyan a Lassen-féle görbe sok kiegészítésre szorul (kiváló áttekintő közlemény céljából az olvasónak ajánlom Brassard és mtsai közelmúltbeli munkáját [4]), az autoregulációs mechanizmus fő céljának demonstrálására alkalmas.

A cerebrovaszkuláris simaizom sejtek intraluminális nyomás által kiváltott myogén válasza (Bayliss-effektus) kulcsfontosságú mechanizmus a CBF autoregulációjában [10-19] (2. ábra). 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 [20-26]. Fontos kiemelni, hogy az agyi vérkeringésben a nagy

proximális artériák a teljes cerebrovaszkuláris rezisztencia jelentős részét (akár 40%-át) képviselik [23, 27-30], és myogén válaszuk kritikus fontosságú annak megakadályozásában, hogy a magas intraluminális nyomás (és pulzusnyomás) az agyi érfa disztális részét (intraparenchymális arteriolák és kapilláris hálózat) elérje [19, 31]. Ennek megfelelően a sorosan összekapcsolt agyi artériák és arteriolák myogén reaktivitása hatékonyan védi a mikrokeringést a vérnyomás gyors változásainak káros hatásaival szemben, amit jól példáz a stabil kapilláris perfúziós nyomás fenntartása az artériás nyomás változásaink ellenére.

Ezenkívül az intraluminális nyomás-változás által kiváltott myogén mechanizmus hozzájárul az agyi artériák és arteriolák bazális tónusához, amire a különböző neurometabolikus és neurovaszkuláris/gliovaszkuláris hatások épülnek.

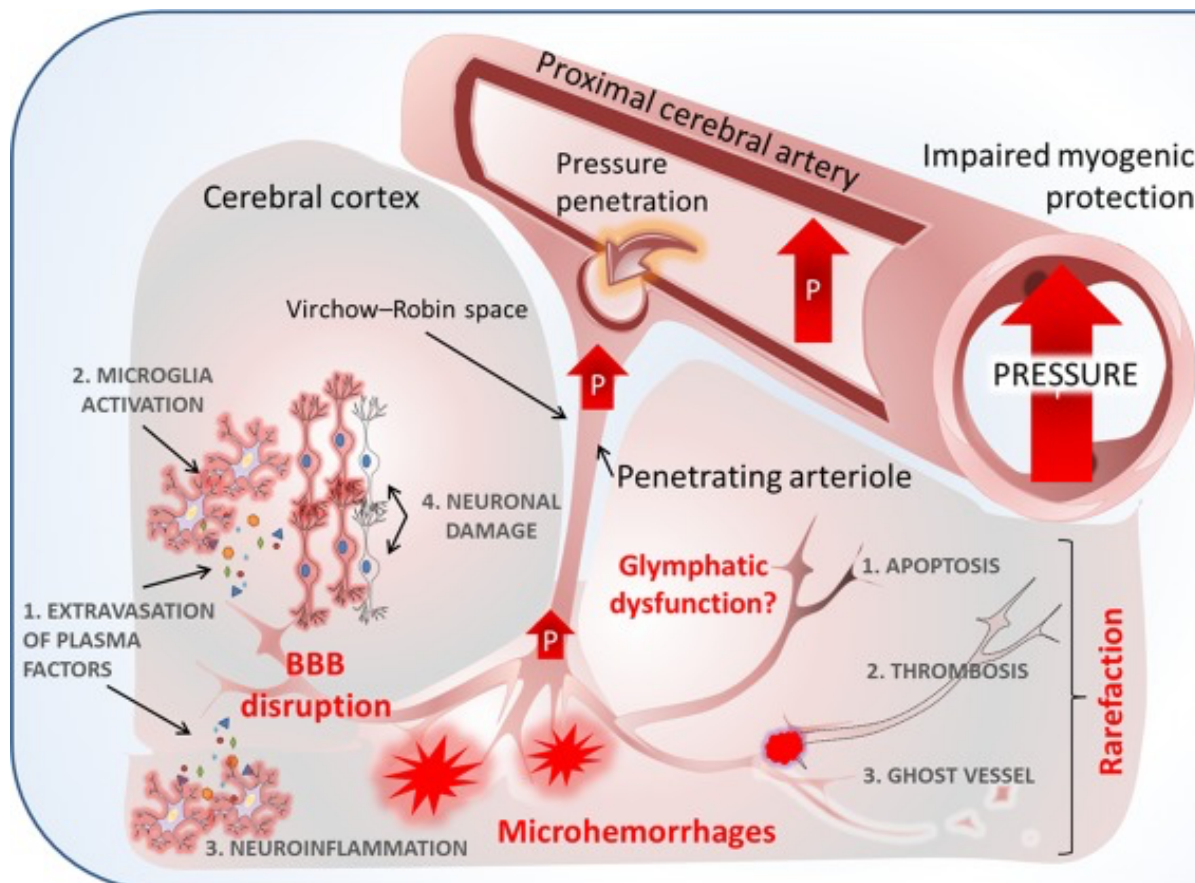


2. ábra. Izolált agyi erek nyomás-indukálta myogén válaszai.

A bal oldalon egy izolált egér arteria cerebri media (MCA) disztális szegmentumának átmérő válasza (diameter) látható az intraluminális nyomás változására, nyomás myográf rendszerben vizsgálva. Az intraluminális nyomás hirtelen megnövekedése (itt 80 Hgmm-re) az ér dilatációját okozza, majd az érfal simaizom rétegének myogén mechanizmusai azonnal vazokonstriktót okoznak, az érátmérő visszaállítását eredményezve. Jobb oldalon n=6 izolált MCA myogén válaszainak szummációs ábrája látható (az intraluminális nyomás-intraluminal pressure függvényében), a szimbólum nélküli görbék az erek passzív nyomás-indukálta átmérő értékeit jelzik, ahonnan az érátmérőt a myogén mechanizmus „visszahúzza”. A myogén válasz által regulált nyomástartomány jól átfed az *in vivo* autoregulációs tartománnyal.

I.1.1. Az agyi erek myogén válaszáának szerepe a cerebro-mikrovaszkulátúra védelmében

A proximális agyi artériák myogén válasza kritikus szerepet játszik a mikrovaszkulátúra 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 [19, 32, 33].



3. ábra. A myogén autoregulációs diszfunkció következményei az intraluminális nyomás növekedése esetén.

Az illusztráción az agy autoregulációs diszfunkciójának következményei láthatók. A modell szerint egészséges fiatal szervezetekben a proximális agyi artériák nyomás által kiváltott myogén konstriktója kritikus homeosztatisz mechanizmusként működik, amely biztosítja, hogy a megnövekedett artériás nyomás ne propagáljon a mikrocirkuláció disztális részébe. Az autoregulációs diszfunkció során a proximális rezisztencia artériák elveszítik a magas nyomáshoz való alkalmazkodási képességüket, ami az agyi mikrocirkuláció károsodásához vezet, illetve azt fokozza. Ennek részeként vér-agy gát zavar (BBB disruption), neuroinflammáció és neuronális károsodás (neuronal damage), mikrovérzések (microhemorrhages), glymphaticus diszfunkció (glymphatic dysfunction) valamint a kapillárisok pusztulása (rarefaction) alakul ki. *Toth P et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 312(1): H1–H20. 2017*

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 [34, 35]. 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. Autoregulációs diszfunkció során a proximális rezisztencia artériák csökkent konstriktiója miatt a nagyobb nyomású (és volumenű) véráramlás a mikrocirkulációt eléri és annak károsodásához vezet. Ennek részeként vér-agy gát zavar, neuroinflammáció és neuronális károsodás, mikrovérzések, glymphaticus diszfunkció, valamint kapilláris pusztulás alakul ki (3. ábra). Az autoregulációnak a magas nyomás okozta mikrokeringési károsodások megelőzése mellett, az intraluminális nyomás csökkenése esetén az agyszövet hipoperfúzióját is el kell kerülnie. Ennek jelentőségét mutatja, hogy hipertóniás idős egyéneknél (akiknél az autoreguláció alsó határa magasabb nyomásértékek felé tolódik) az agyi autoreguláció diszfunkciója miatt hipotenzio során nem megfelelő dilatáció hipoperfúziót és ezáltal ischaemiás központi idegrendszeri károsodást okoz [36].

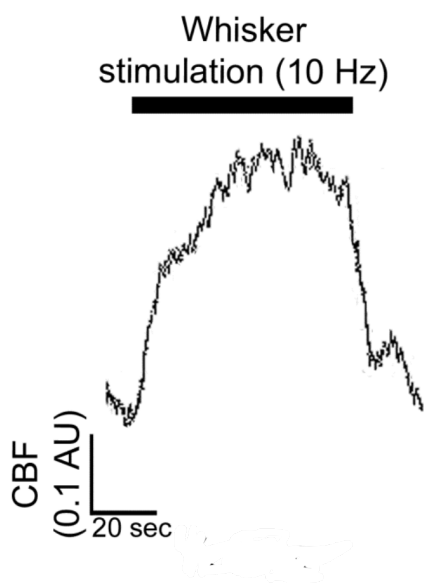
1.1.2. A nyomás-indukálta myogén válasz celluláris mechanizmusai

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 [37-41]. 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-hidroxyeikozatetraén-savat (20-HETE) termel [16, 42, 43]. A nyomásnövekedés 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+} csatorna, valamint tranziens receptor potenciál csatorna 6 (TRPC6) aktiválásához vezet, amelyek elősegítik a vaszkuláris simaizomsejtek depolarizációját, növelik az intracelluláris Ca^{2+} szintet és elősegítik a Ca^{2+} -indukált, aktin-miozin kapcsolaton alapuló érösszehúzódást [18]. A 20-HETE autoregulációban betöltött központi szerepét támasztja alá, hogy termelésének gátlása *in vitro* izolált érpreparátumban vizsgálva gyengíti a nyomás által kiváltott artériás myogén összehúzódást, valamint *in vivo* patkánymodellben rontja a CBF autoregulációját [18]. Itt fontos megjegyezni, hogy (részben kutatócsoportunk által demonstrálva) krónikus magasvérnyomás esetén patkányban és egérben a magas

vérnyomáshoz való autoregulációs adaptáció háttérében álló megnövekedett myogén választ a 20-HETE fokozott, hipertónia-által indukált termelése idézi elő (ld. később) [19, 42, 44, 45]. A 20-HETE-szintézis [46] szerepén kívül meg kell említeni, hogy más útvonalak is hozzájárulnak a nyomás-indukálta simaizom depolarizációt követő érösszehúzódáshoz (egyéb “megnyúlás-aktivált” TRP-csatornák (TRPM4) [47], kloridcsatornák[48], integrinek és egyéb citoskeletális elemek [49, 50]). 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 szerepük van [51-53].

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 oxigénszállítás 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 [54, 55]. Ezt a funkcionális hiperémiát eredményező „feed forward” jellegű mechanizmust, amely fenntartja az optimális mikrokörnyezetet a normális idegi működéshez, neurovaszkuláris kapcsolásnak (neurovascular coupling, NVC) nevezzük [56]. A neurovaszkuláris kapcsolás a neuronok, astrocyták, az endothélséjtek és az agyi arteriolák simaizomsejtjeinek összehangolt egymásra hatása során jön létre [56]. Újabb irodalmi eredmények szerint a kapillárisok



4. ábra. Neurovaszkuláris kapcsolás a szomatoszenzoros kéregben. A kísérletes regisztrátumon a lokális agyi véráramlás (CBF) azonnali emelkedése látható, egér szomatoszenzoros kérge fölött elhelyezett lézer Doppler szenzorral mérve az ellenoldali bajusz-párna (whisker) 10Hz-es stimulációját követően. A stimuláció végén a CBF azonnal visszatér a korábbi alapvonalra.

kontraktilis pericytáinak aktivációja és a következményes kapilláris dilatáció is szerepet játszhat az NVC kezdeti fázisában [57]. 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 nitrogén-monoxid (NO) [58, 59] és/vagy a neuronális prosztaglandin felszabadulás [60] hozzájárulhat az agyi arteriolák tágulásához mind közvetve, az astrocytákban történő mechanizmusok modulálásával, mind pedig közvetlenül az arteriolák simaizomsejtjeire 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 [61]. A glutamát aktiválja az astrocyták metabotróp glutamát receptorait (mGluR) és NMDA receptorait [62], amelyek az astrocytákon 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 tranziens receptor potenciál vanilloid csatorna 4 (TRPV4) aktiválásán keresztül [63, 64]. Patológias körülmények között az arachidonsav a neurovaszkuláris egységben 20-HETE-vé alakulhat át, ami az agyi arteriolák összehúzódását váltja ki, ellensúlyozva az EET-ek, prosztaglandinok és NO által közvetített dilatációs hatásokat [65, 66]. A jelenlegi nézet szerint a dilatátor és konstriktor hatású arachidonsav metabolitok közötti egyensúlyt többek között az agyi erek korábbi tónusa, a szöveti O₂ szint és a NO elérhetősége befolyásolja. Az egyik legfontosabb jelzőmolekula, amelyen keresztül az astrocyták egymással és más sejtekkel kommunikálnak, az ATP (és metabolitjai, az adenzin és az ADP). Mivel az ATP közvetlenül kapcsolódik az astrocyta metabolizmushoz, logikus feltételezni, hogy a purinerg útvonalak részt vesznek a neurovaszkuláris kapcsolatban. Valóban, részben kutatócsoportunk bizonyította, hogy az astrocyta eredetű ATP, miután adenzinná hidrolizálódott, hozzájárul az agyi reaktív hiperémiához a vaszkuláris simaizomsejtek A_{2A} purinerg receptorain keresztül. Ezen az útvonalon kívül a neuronális aktiváció hatására felszabaduló astrocyta-eredetű ATP az endotheliális P_{2Y1} receptorokra is hat, rajtuk keresztül indukálja az endothelialis NO termelődését és az ezt követő értágulatot [62, 67-69]. A neurovaszkuláris kapcsolatban a neuronális aktiváció során megnövekedő extracelluláris K⁺ is központi szerepet játszhat. A „K⁺

szifon” elmélet szerint [70, 71] az astrocyták a neuronális aktivációt követően a felesleges extracelluláris K^+ -t felveszik és az arteriolák perivaszkuláris terében azt felszabadítják. A perivaszkuláris térben lévő K^+ aktiválja a simaizom sejtek „inward rectifying” kálium csatornáit (K_{ir}), a kialakuló, kifelé irányuló K^+ áram hiperpolarizációhoz, a simaizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} csökkenéséhez, és az agyi arteriolák dilatációjához vezet [70, 71]. A glutamát által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ növekedés BK_{Ca} csatornákat nyithat meg az astrocyta végtalpakon, és ezáltal szintén astrocyta-eredetű K^+ -t juttathat az agyi arteriolákhoz [72]. A kapillárisokat fésűszerűen körbe ölelő pericyták is részt vehetnek a neurovaszkuláris hiperémiában, a kapillárisok PGE_2 - és NO -függő dilatációján keresztül [57].

Mint említettem, az aktív agyi területek megnövekedett energiaigényét a lokálisan illesztett véráramlás növekedés elégíti ki [73], ennek hiányában megbomlik az aktív agyterület metabolikus igénye és a tápanyag-oxigén ellátás közötti egyensúly [74]. A neurovaszkuláris kapcsolat károsodása ennek megfelelően minden bizonnyal az agyműködés funkcionális károsodásával jár. Ezt a koncepciót számos állatkísérletes és humán vizsgálat támogatja [75-78]. A neurovaszkuláris szét-kapcsolás idegrendszeri funkciókárosító hatásáról (elsősorban a kognitív funkcióban) az értekezés 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 kapcsolás 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 kapcsolás kognitív funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata, az öregedés-okozta neurovaszkuláris károsodás mechanizmusainak feltárása preklinikai modellekben, azt követően pedig, a kapott eredmények alapján emberben.

A könnyebb követhetőség kedvéért az alkalmazott módszerek részletes leírásától az eredményeket bemutató fejezetekben eltekintek, azokat részletesen az értekezés végén, külön Módszer fejezetben tárgyalom.

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

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 [79]. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy időseknél a magas vérnyomás okozta mikrovaszkuláris károsodás elősegíti a vaszkuláris etiológiájú kognitív hanyatlás (VCI) [80, 81] 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 [82-84]. Másként fogalmazva, az előrehaladott életkor és a magas vérnyomás szinergikus hatást fejtenek ki a cerebrovaszkulátúra károsodásában és következményeinek kialakulásában. Azok a mechanizmusok azonban, amelyeken keresztül az öregedés növeli az agyi érrendszer sérülékenységét a VCI-hez vezető magas vérnyomással szemben [85], vizsgálataink előtt nem voltak ismertek.

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 [86, 87]. Ezen adaptív válaszok között nagy jelentősége van az agyi artériák megnövekedett nyomás-indukálta myogén konstriktójának [29, 88, 89]. A fokozott nyomás-indukálta vazokonstriktió megnövekedett vaszkuláris rezisztenciához vezet, ami állandó, normális tartományon belüli nyomás és volumen értékeket tart fenn a disztális cerebrális mikrocirkulációban. Ennek az adaptív válasznak az eredményeként az agyi véráramlás autoregulációjának tartománya magasabb nyomásértékek felé (az autoregulációs görbén „jobbra”) tolódik mind hipertóniás állatokban, mind hipertóniás betegeknél [86, 87, 90]. A magas vérnyomás és a stroke állatmodelljein végzett korábbi vizsgálatok [91] arra

utaltak, hogy az autoregulációs védelem kóros elvesztése hozzájárul a cerebrovaszkuláris károsodáshoz. Ennek 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 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 és kognitív funkcióra.

Eredmények

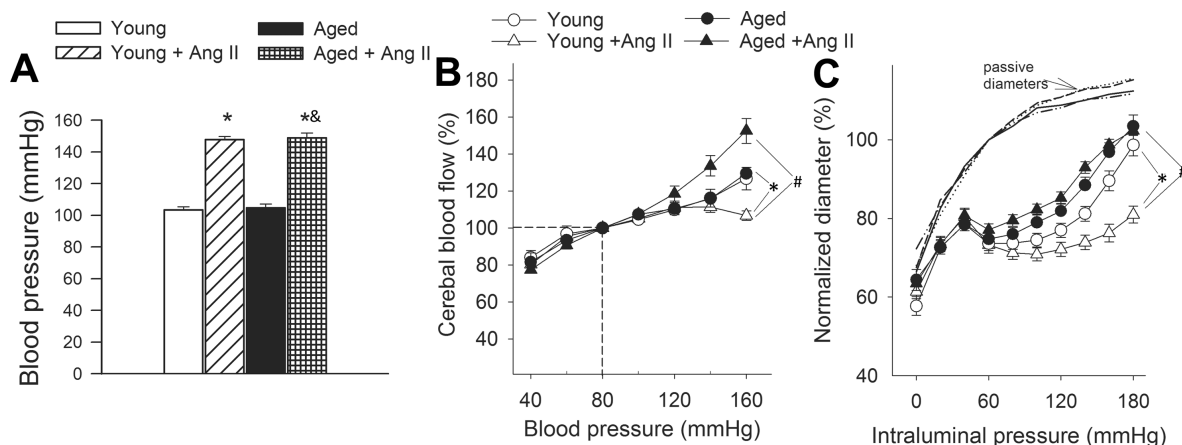
A CBF autoregulációjának károsodása idős hipertóniás egerekben

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 (5. ábra).

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

Fiatal, normotenziós kontroll egerekből izolált arteria cerebri mediában (MCA) az intravaszkuláris nyomás növekedése, kb. 60 Hgmm-nél kezdődve, myogén összehúzódást váltott ki, majd a myogén konstriktió közel azonos szinten maradt ~120 Hgmm-ig, átfedve az *in vivo* látott autoregulációs tartománnyal. Elérve az autoregulációs tartomány felső határát, a myogén tónus csökkenni kezdett, az artériák dilatáltak. 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 konstrikciónal párhuzamosan, fiatal, hipertóniás egerek agyi ereinek simaizom intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja (SMC $[Ca^{2+}]_i$) is szignifikánsan növekedett magas nyomásértékek hatására. Idős egerek MCA-iban enyhén csökkent a myogén összehúzódás, valamint az erek nem mutattak hasonló, magas vérnyomás által kiváltott adaptív növekedést sem az SMC $[Ca^{2+}]_i$ -ben, sem a myogén összehúzódásban (5. ábra).

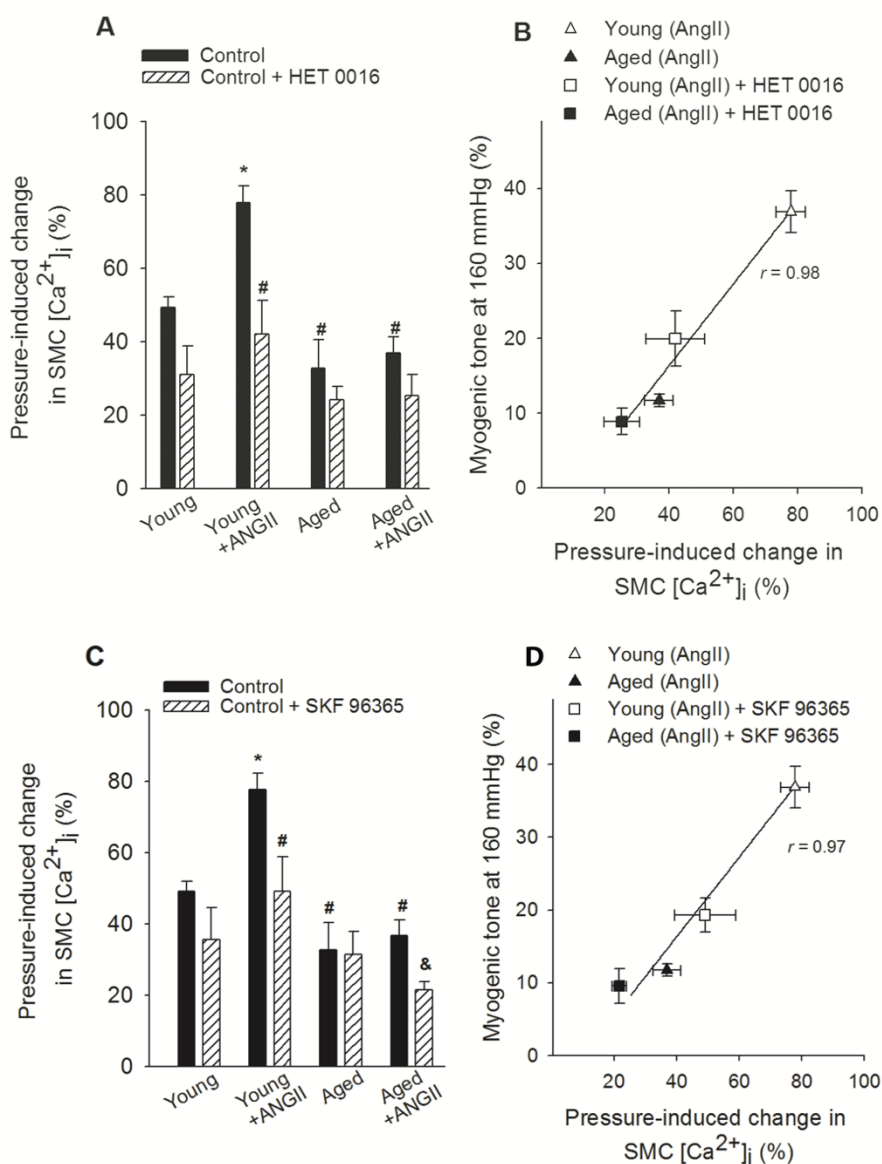


5. ábra. Az öregedés károsítja a cerebrovaszkuláris autoreguláció adaptációját magas vérnyomáshoz. (A) Angiotensin II (AngII) krónikus adásának hatása a szisztolés vérnyomásra fiatal (Young, 3 hónap) és idős (Aged, 24 hónap) egerekben. (n=20-25 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Young; & $p < 0,05$ vs. 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, 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 egércsoportokból 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).

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 termelés specifikus inhibitora (HET0016), mind a TRPC6 csatorna gátlószere (SKF96365) szignifikánsan megakadályozta, ugyanakkor, sem a HET0016, sem az SKF96365 nem befolyásolta szignifikánsan a myogén tónust és SMC $[Ca^{2+}]_i$ -t idős, hipertóniás egerek agyi ereiben (6. ábra). A 20-HETE által

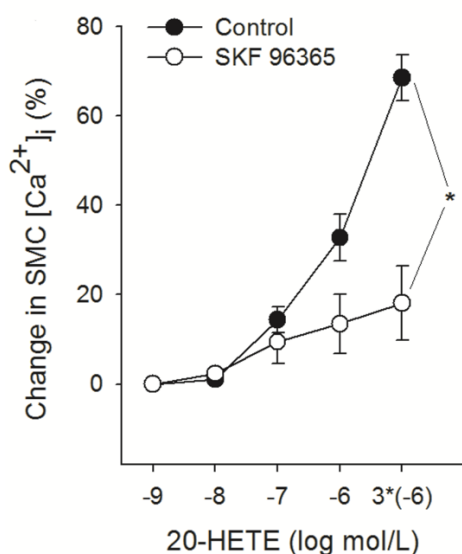
okozott vazokonstrikció gátolható volt TRPC6-inhibitor SKF96365-tel, azt sugallva, hogy a nyomás-indukálta termelődést követően a 20-HETE a TRPC6 csatorna aktiválásán keresztül okoz fokozott SMC $[Ca^{2+}]_i$ -ot, valamint vazokonstrikciót fiatal, hipertóniás egerek agyi ereiben, és ez a mechanizmus hiányzik idős, hipertóniás egerekben (7.ábra). 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 károsodtak voltak, vagy hiányoztak idős, hipertóniás egerek MCA-iban.



6. ábra. A 20-HETE és a TRPC6 szerepe idős, hipertóniás egerek agyi ereinek magassvérnyomással szemben mutatott károsodott adaptációjában

A: A simaizomsejtek (SMC) intracelluláris kalcium koncentrációjának ($[Ca^{2+}]_i$) változása izolált arteria cerebri media-ban (MCA) az intraluminális nyomás növekedésének (20 Hgmm-ről 160 Hgmm-re) hatására a specifikus citokróm P450 ω -hidroxiláz inhibitor HET0016 hiányában és jelenlétében fiatal (Young), és idős (Aged) normotenzív, valamint hipertóniás (Young+ANGII, Aged+ANGII) egerekben.

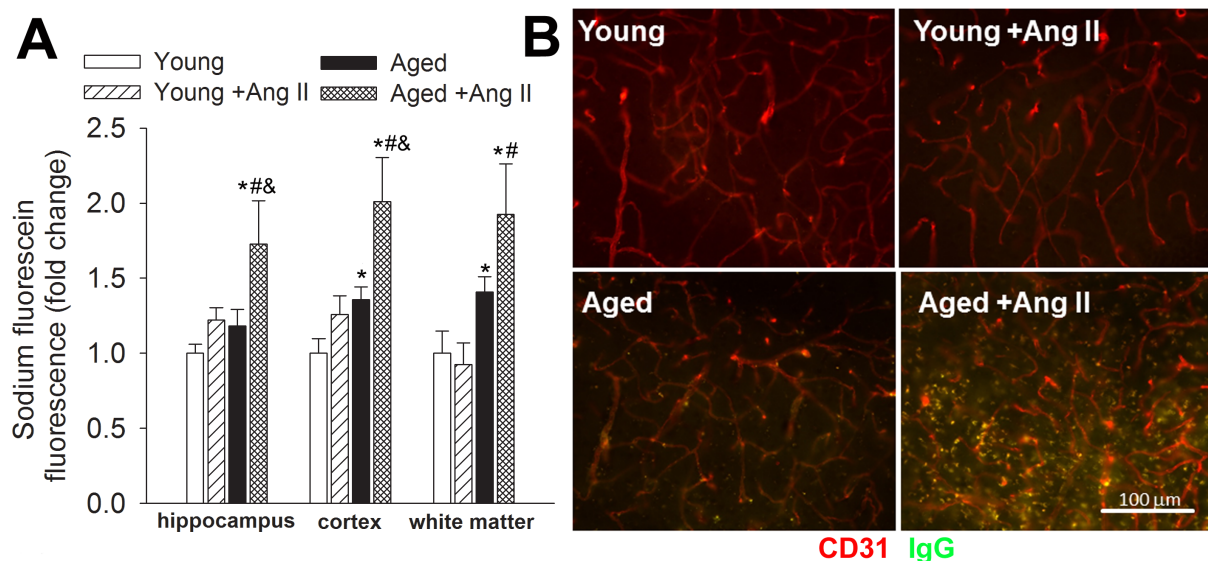
Az adatokat a KCl (60 mM) által indukált kalcium jel százalékában fejezzük ki (n=8, minden csoportban, * $p < 0,05$ vs. Young, # $p < 0,05$ vs. Young + AngII). **B:** Az SMC $[Ca^{2+}]_i$ nyomás (160 Hgmm) által kiváltott változásai, és az MCA-k myogén tónusa közötti kapcsolat fiatal és idős, hipertóniás egerekben, HET0016 hiányában és jelenlétében. **C:** Nagy intraluminális nyomás (160 Hgmm) által kiváltott SMC $[Ca^{2+}]_i$ változása a fenti csoportok MCA-iban, a TRPC6 gátlószer SKF96365 hiányában és jelenlétében (n=8, minden csoportban, * $p < 0,05$ vs. Young, # $p < 0,05$ vs. Young+AngII, & $p < 0,05$ vs. Aged+AngII). **D:** Az SMC $[Ca^{2+}]_i$ nagy nyomás (160 Hgmm) által kiváltott változásai, és a myogén tónus közötti kapcsolat fiatal és idős, hipertóniás egerekből izolált MCA-kban, SKF96365 hiányában és jelenlétében (n=8, minden csoportban).



7. ábra. A TRPC 6 csatorna szerepe a 20-HETE-indukálta intracelluláris kalcium koncentráció növekedésében, egér arteria cerebri media simaizom sejtjeiben. Az TRPC 6 csatorna blokkolója (SKF96365) gátolja a simaizom sejtek (SMC) 20-HETE által kiváltott intracelluláris kalcium $[Ca^{2+}]_i$ növekedését izolált patkány arteria cerebri mediában. Az adatokat 60 mM KCl által indukált kalcium jelek százalékában fejezzük ki (n=8, * $p < 0,05$).

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. Az öregedés önmagában is növelte a vér-agy gát zavart jelző nátrium-fluoreszcein extravazációt, de ez csak a cortexben és a fehérállományban ért el statisztikai szignifikanciát fiatal, normotenzív állatokkal összehasonlítva. 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 (8. ábra). Az idős, hipertóniás egerek strukturális vér-agy gát károsodására utal, hogy ezen állatok hippocampalis mintáiban a vér-agy gát tight-junction fehérjéinek (ZO-1, occludin, claudin 5) csökkent expresszióját találtuk.



8. ábra. Az öregedés súlyosbítja a magas vérnyomás okozta vér-agy gát zavart. **A:** Hippocampális, cortikális és fehérállomány nátrium-fluorescein tartalom a tracer injekciója és az állatok transcardiális perfúziója után fiatal kontroll (Young), fiatal hipertóniás (Young+AngII), idős kontroll (Aged) és idős hipertóniás (Aged+AngII) egerekben ($n=6-10$, $*p<0,05$ vs. Young, $\#p<0,05$ vs. Young+AngII; $\&p<0,05$ vs. Aged). **(B)** A plazmából származó IgG (zöld) extravazációja CD31-pozitív mikroerek (piros) környezetében (konfokális mikroszkóppal), fiatal és idős egerek hippocampusában, AngII-indukált magas vérnyomással vagy anélkül.

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

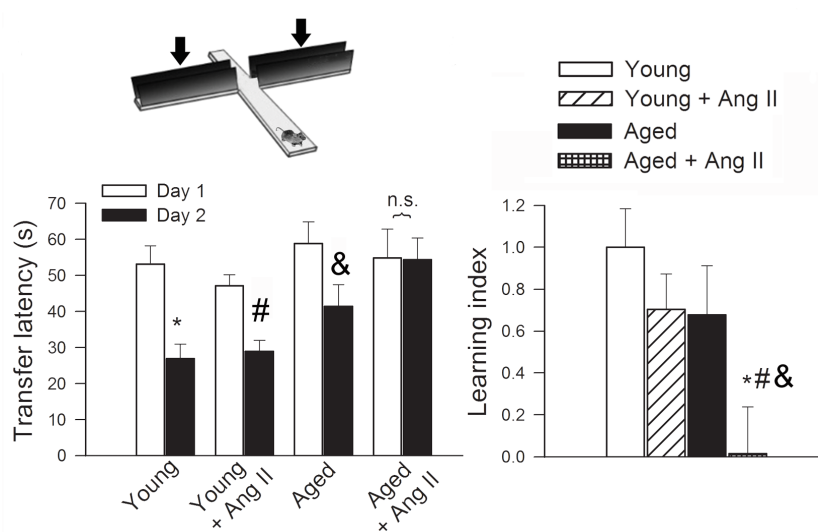
Több korábbi tanulmány felveti a pericyták központi szerepét a vér-agy gát működés fenntartásában, azok pusztulása a BBB integritásának megromlásához vezet [92]. Felmérve a hippocampalis mikroerek pericyta-borításának életkor és magas vérnyomás okozta változásait, fiatal egerekben a hipertónia a pericyták 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 növekedett (~41%-kal). Azt is meghatároztuk, hogy a pericyták elvesztése mellett változik-e az agyszövet kapilláris sűrűsége idős, hipertóniás egerekben. A kapillárisokat az endotheliális CD31 expressziója alapján azonosítottuk, 10 μm vagy kisebb lumenátmérőt használva. 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

Korábbi vizsgálatok felvetik, hogy a károsodott BBB-n keresztül a parenchymába extravazálódott faktorok microglia aktivációt és neuroinflammációt válthatnak ki [93]. Eredményeink szerint, fiatal egerek hippocampusában alacsony volt az aktivált microglia száma, és a magas vérnyomás okozta változások a microglia aktivációban nem értek el statisztikai szignifikanciát. Ugyanakkor, 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

Annak megállapítására, hogy a károsodott BBB funkció, a mikrovaszkuláris sűrűség csökkenés, az oxidatív/nitrozatív stressz, és a krónikus neuroinflammáció előidéz-e idegrendszeri diszfunkciót a vizsgálati csoportokban, meghatároztuk a hippocampális tanulást és memóriát. 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



9. ábra. Az öregedés és a magas vérnyomás hatása a kognitív funkcióra. „Elevated plus maze” tanulási protokolljával felmérve idős, hipertóniás (Aged+ANGII) egerek esetében a transzfer latencia hasonló volt az 1. és 2. napon (tanulási indexnek: ~0), ami azt jelzi, hogy ezeknek az egereknek a hippocampális kognitív funkciója jelentősen károsodott (n=20, * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Young+AngII; és & $p < 0,05$ vs. Aged).

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 jelentősen károsodott.

Megbeszélés

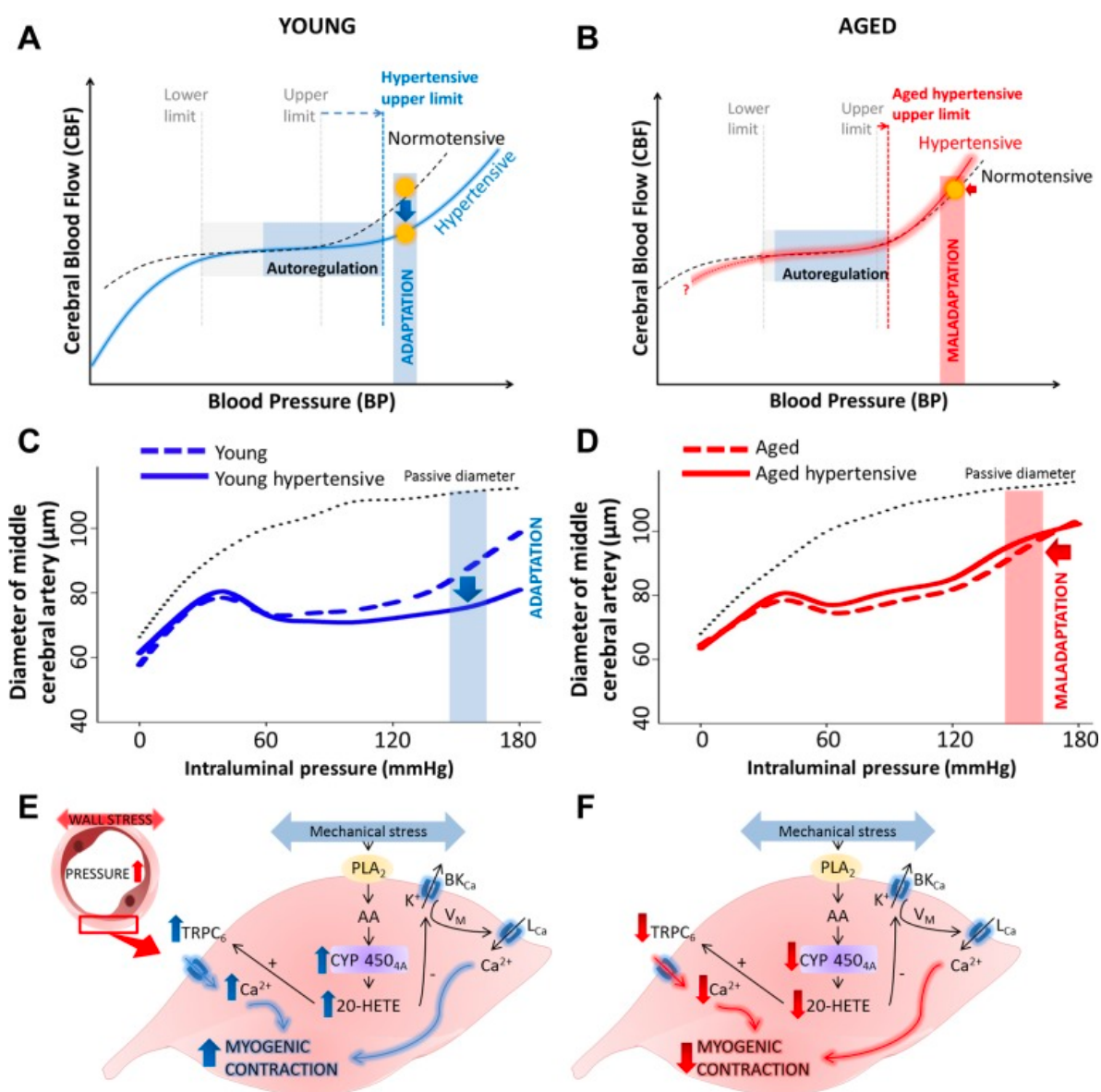
Az agyi vérkeringésben a pialis artériák és arteriolák jelentős szerepet játszanak a cerebrovaszkuláris rezisztenciában, a Willis-kör fő ereinek disztális szegmentumainak myogén összehúzódása egyedülállóan fontos az agyi mikrocirkuláció védelmében [27]. Egészséges, fiatal állatokban a nyomás-növekedés által kiváltott myogén konstriktió kritikus homeosztatisz mechanizmusként működik, amely biztosítja, hogy a megnövekedett artériás nyomás ne propagáljon a mikrocirkuláció disztális részébe [29, 88]. Hipertóniás, fiatal egerekben és patkányokban [89, 94] 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 [29, 86-89]. A fent részletezett vizsgálatok voltak az elsők, amelyek bemutatták, hogy idős egerek agyi artériái nem mutatnak magas vérnyomás által kiváltott adaptív myogén összehúzódást. Számos eredmény támasztja alá azt az elképzelést, hogy fiatal állatokban egy 20-HETE/TRPC6-függő útvonal aktivációja vezet az agyi artériák funkcionális adaptációjához magas vérnyomás esetén, és hogy ez az adaptív válasz az öregedés során nem működik. Fiatal hipertóniás egerekben a 20-HETE fokozott nyomás-indukálta simaizom sejt intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést és következményes fokozott myogén konstriktiót hoz létre magasabb nyomástartományban (amely megfelel ezen állatok vérnyomásának). Valószínű, hogy ez a citokróm P450 4A ω -hidroxilázok fokozott expressziójának és működésének köszönhető. Hasonlóképpen, fiatal hipertóniás patkányokban a nyomás által kiváltott 20-HETE termelés az agyi artériákban jelentősen megnövekszik [45]. Ez a 20-HETE-függő adaptív válasz károsodott az idős hipertóniás egerekben. Ezzel összhangban a Cyp4A12 expressziója (a 20-HETE fő forrása az agyi artériákban [95]), valamint a CypA10 és CypA14 expressziója (amelyek szintén képesek 20-HETE előállítására [96]) szignifikánsan csökkentek az idős hipertóniás állatok agyi ereiben a fiatal hipertóniás állatokhoz képest. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a 20-HETE által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést a vaszkuláris simaizomsejtekben TRPC6-csatornák mediálják [97], ami részt vesz az autoregulációs funkcióban az agyi artériák myogén konstriktiójának létrehozásával [41]. Eredményeink szerint míg fiatal egerek agyi artériáiban a magas vérnyomás fokozza a TRPC6 expresszióját és a TRPC6-függő nyomás-indukálta SMC

Ca²⁺ 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. A magas vérnyomás okozta BBB-zavar mechanizmusai valószínűleg sokrétűek. A pericyták a BBB fontos sejtes összetevői [93]. Ennek megfelelően közelmúltbeli tanulmányok azt mutatják, hogy a pericyták hiánya *Pdgfr β* ^{+/-} egerekben a BBB funkció jelentős károsodásával jár [92] és VCI-szerű, kognitív hanyatlással járó szindróma kialakulásához vezet. Ennek megfelelően a vizsgálatainkban bemutatott kapilláris pericyta-lefedettség csökkenése hozzájárulhat a látott BBB-zavarhoz, valamint a BBB struktúrájának károsításával annak ozmotikus kompenzációs lehetőségeit is csökkentheti. Az idős, hipertóniás egerek fokozott pericyta veszteségének mechanizmusa nem ismert. A pericyták érzékenyek az oxidatív károsodásra, így lehetséges, hogy a hipertónia által kiváltott oxidatív stressz hozzájárul a fokozott pericyta vesztéshez idős hipertóniás egerekben. A pericyták az agyi mikrocirkuláció szerkezeti integritásának megőrzésében is kulcsszerepet játszanak [98], így azok elvesztése valószínűleg szintén hozzájárul a kapilláris denzitás csökkenés kialakulásához idős hipertóniás egerek agyában. Jövőbeni vizsgálatoknak tisztázni kell, hogy az idős hipertóniás egerekben a csökkent kapilláris-sűrűség közvetlen összefüggésben áll-e a hippocampális perfúzió csökkenésével.

Idős, magas vérnyomású egerekben a sérült BBB-n keresztül a plazma összetevői, beleértve az IgG-t, bejuthatnak az agyba. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a plazmából származó faktorok többféle mechanizmussal is befolyásolhatják az idegsejtek működését [93, 99]. Ezek közül a legjelentősebbnek az extravazált plazma összetevők által okozott neuroinflammáció tűnik (erre jó példa az IgG által Fc receptoron keresztül mediált microglia aktiváció). Ezekkel az elképzelésekkel 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 [100, 101]. 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.

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 (10. ábra).



10. ábra. Az öregedés károsítja az agyi véráramlás (CBF) autoregulációjának adaptációját magas vérnyomáshoz. Normális körülmények között a CBF autoregulációja közel állandó véráramlást tart fenn, a perfúziós nyomás változásainak ellenére. Ezt az agyi artériák nyomás által kiváltott myogén konstriktiója biztosítja, amely a vaszkuláris ellenállást a perfúziós nyomás változásaihoz illeszti. Hipertóniás fiatal kísérleti állatokban és emberben az agyi artériák myogén konstriktiója fokozódik (C),

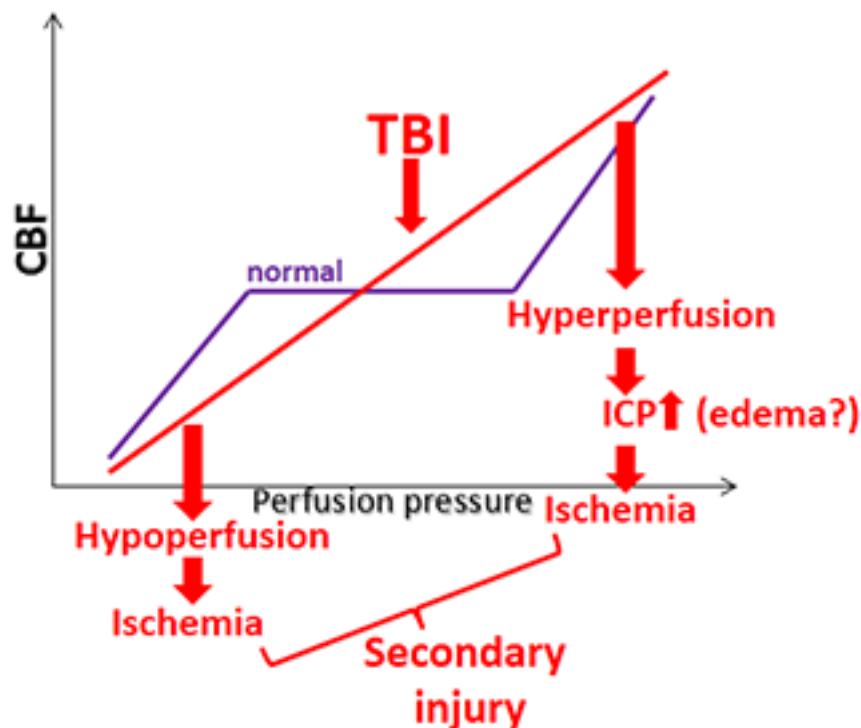
ezáltal az agyi autoreguláció tartománya nagy nyomások felé tolódik **(A)**, ezen funkcionális alkalmazkodáson keresztül optimalizálva a szöveti perfúziót és védve az agyi mikrokeringést. Öreg hipertóniás egerek agyi artériái nem mutatnak adaptív növekedést a myogén összehúzódásban **(D)**, ami az autoregulációs mechanizmus diszfunkciójaként nyilvánul meg **(B)**. **E**: Fiatal hipertóniás egerekben az agyi artériák magas vérnyomáshoz való funkcionális adaptációjának hátterében a 20-hidroxi-eikozatetraén-sav (20-HETE)/tranzien receptorpotenciál kationcsatorna (TRPC) 6-függő útvonal aktiválása áll. Ez az adaptív útvonal deficiens öreg hipertóniás egerek agyi ereiben **(F)**. Ennek megfelelően a fiatal agyi artériák simaizomsejtjeiben a nagy intraluminális nyomás által kiváltott mechanikai stressz az arachidonsav-metabolizmus (AA) foszfolipáz A2 (PLA2)-függő aktiválásához, valamint 20-HETE-t termelő CYP450 izoformok fokozott expressziójához vezet. A vazokonstriktor eikozanoid 20-HETE megnövekedett termelése aktiválja a TRPC6-csatornákat, amik a vaszkuláris simaizom Ca^{2+} -koncentrációjának növekedését és az ezt követő fokozott myogén konstriktiót eredményezik. A 20-HETE feltehetőleg blokkolja a hyperpolarizáló Ca^{2+} aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornák aktiválódását is, ami hozzájárulhat a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} (L_{Ca}) csatornák fokozott nyomás-indukált aktiválásához és fokozott myogén összehúzódáshoz. **F**: az idős agyi artériákban a 20-HETE/TRPC 6-dependens útvonal aktiválása által közvetített magas vérnyomáshoz való funkcionális alkalmazkodás károsodott (piros nyílak). *Toth P et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 312(1): H1–H20. 2017*

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 [102]. A TBI körülbelül 1,7 millió embert érint évente az Egyesült Államokban [102-104] és 2,5 millió beteget az Európai Unióban [104], a halálozási arány 35–40%. Az Egyesült Államokban körülbelül 5,3 millió ember él TBI-vel összefüggő fogyatékkal [103], az EU-ban pedig 7,7 millió ember [104]. Az előbbieket alapján epidemiológiai jelentőségét nem lehet túl hangsúlyozni. 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. Ezek közé tartozik az agyi véráramlás szabályozási zavara, ami hozzájárul az agyödéma és a magas intracraniális nyomás (ICH) kialakulásához, meghatározva a trauma kimenetelét [105]. Mivel a másodlagos agykárosodás potenciálisan megelőzhető, a háttérben álló mechanizmusok jobb megértése terápiás beavatkozások fontos célpontjait azonosíthatja.

Egyre több kísérleti és klinikai bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a TBI rontja az agyi véráramlás autoregulációját [106-118], amiben, hasonlóan az időskori autoregulációs funkciózavarhoz, az agyi rezisztenciaerek nyomás által kiváltott myogén konstriktójának károsodása központi szerepet játszhat [119-122]. Súlyos koponya trauma után, az autoregulációs diszfunkciónak köszönhetően a szisztémás vérnyomás csökkenése esetén a túlzott hipoperfúzió az agyszövet ischemiás károsodását okozhatja, a vérnyomás emelkedésével járó hiperperfúzió és volumentúlterhelés pedig a mikrocirkuláció károsodásához vezethet [19]. A jelenség nyilvánvaló kórtani jelentősége ellenére [106-109, 122, 123] az agyi artériák súlyos TBI-t követő myogén autoregulációs diszfunkciójának hátterében álló sejtes és molekuláris mechanizmusok nem voltak ismertek.



11. ábra. A traumás agysérülés utáni autoregulációs diszfunkció következményei. Ha az autoregulációs funkció intakt (lila vonal), akkor a perfúziós nyomás (perfusion pressure) változásai ellenére az agyi véráramlás (CBF) közel állandó marad. Traumás agysérülést követően a CBF autoregulációja sérül, így a CBF passzívan változik a perfúziós nyomás függvényében (piros vonal). Amikor a perfúziós nyomás csökken, az autoregulációs diszfunkció jelentős hipoperfúziót és agyi ischemiát eredményez. Ezzel szemben, ha a perfúziós nyomás növekszik, az autoregulációs diszfunkció agyi hiperperfúziót eredményez, ami megnövekedett koponyaűri nyomáshoz, citotoxikus és vazogén ödéma kialakulásához vezet. Az oxigén- és tápanyagellátás ebből eredő csökkenése hozzájárul az agyszövet másodlagos károsodásához, növeli a mortalitást és veszélyezteti a traumás agysérülés (TBI) utáni funkcionális felépülést.

Korai tanulmányok felvetették, hogy a TBI-t követő oxidatív stressz vazodilatációt vált ki a piális erekben [124]. A szabadgyökök pontos mibenléte, forrása, valamint szerepe a TBI-indukálta vaszkuláris diszfunkcióban azonban ismeretlen maradt. A TBI után kialakuló mitokondriális diszfunkció a szabadgyök termelés egyi fő forrása lehet. Ez 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 konstriktiójáért. 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}) [125-128][129-131]. Ezért szintén feltételeztük, hogy a TBI-okozta mitokondriális H_2O_2 ezen az útvonalon károsítja az agyi erek myogén konstriktióját.

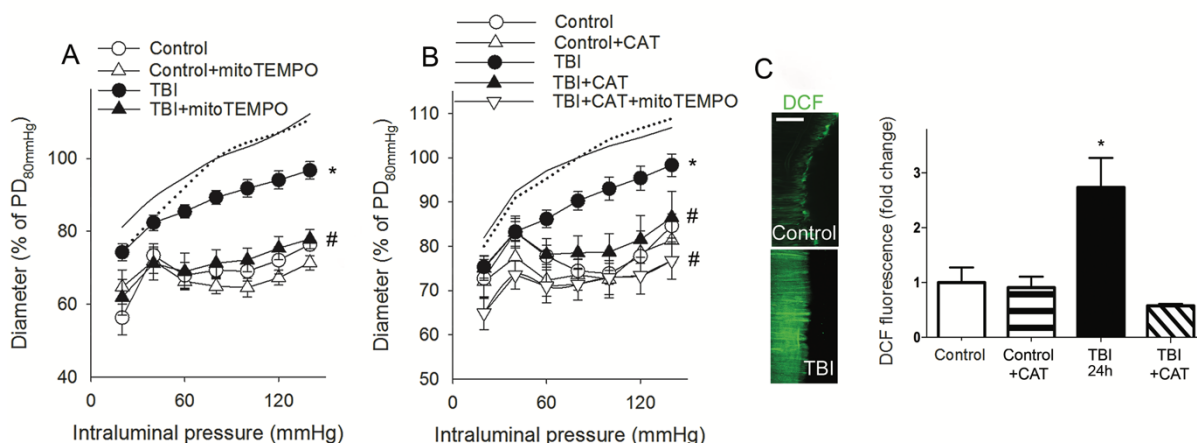
Hipotéziseink teszteléséhez súlyos diffúz koponya traumát idéztünk elő patkányokban, majd megvizsgáltuk az állatokból izolált arteria cerebri media-k (MCA) H_2O_2 termelését, valamint nyomás-indukálta myogén válaszait mitokondriális szabadgyök fogók jelenlétében. Ezt követően meghatároztuk a TRPV4 és BK_{Ca} csatornák specifikus blokkolóinak hatását az agyi artériák TBI által kiváltott myogén autoregulációs diszfunkciójára, meghatároztuk a 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 konstriktiójában súlyos agysérülés után

Azt találtuk, hogy a patkányokból 2 órával a súlyos TBI után izolált MCA-k myogén összehúzódásai sértetlenek voltak, azonban az MCA-k myogén válaszai 24 órával a traumás agysérülés után szignifikánsan csökkentek a kontroll MCA-hoz képest az autoreguláció nyomástartományában (60-140 Hgmm között). A mitokondriális antioxidáns mitoTEMPO visszaállította a TBI után csökkent myogén konstriktiót a kontroll MCA-k szintjére, ami arra utal, hogy a mitokondriumból 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 (12. ábra).

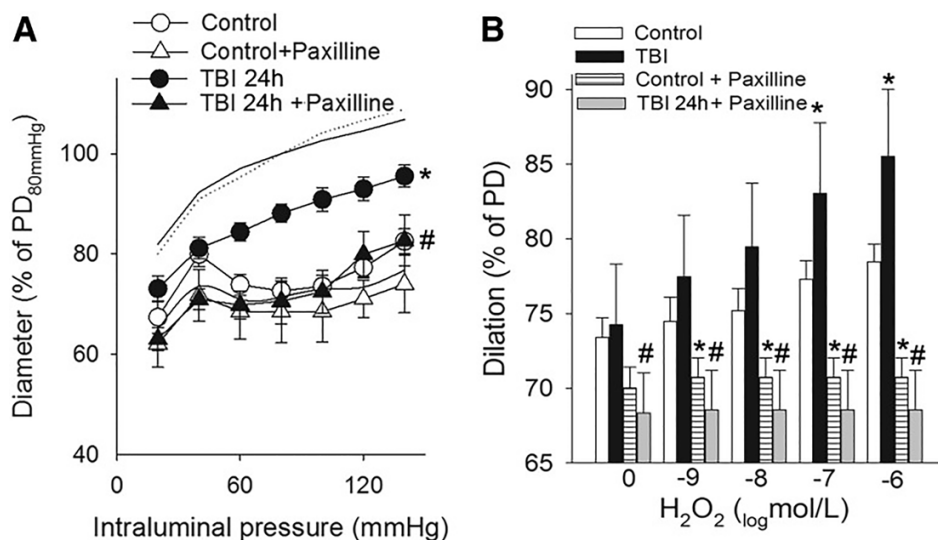


12. ábra. A TBI károsítja az agyi artériák myogén összehúzódását: a mitokondriális H_2O_2 szerepe.

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 H_2O_2 -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 H_2O_2 termelést a sejtpermeábilis oxidatív fluoreszcens indikátor festék DCF fluoreszcenciája mutatja. (skála: 50 μ m, $n=5$ csoportonként, $*p<0,05$ vs. Kontroll).

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

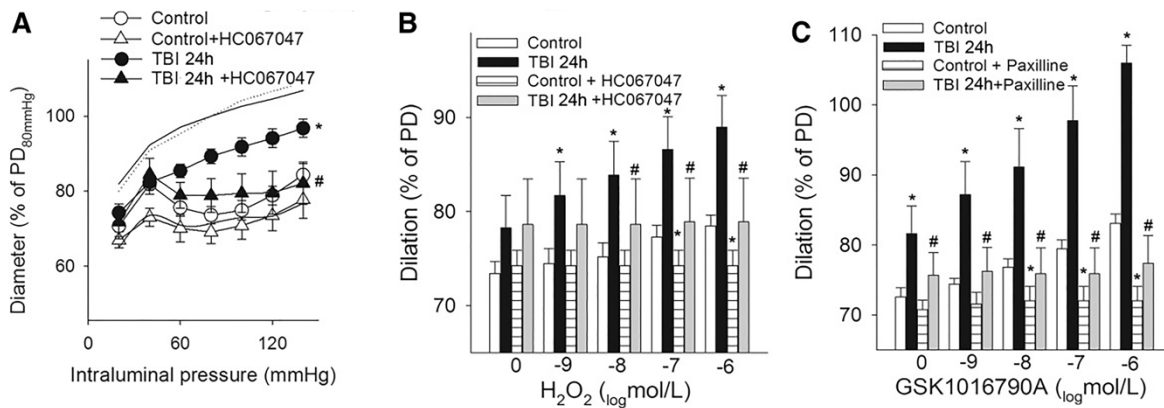
A BK_{Ca} csatornák specifikus gátlása paxillinnel izolált MCA-kon a TBI utáni gyengült myogén konstriktiót a kontroll szintre állította vissza. Ezen túlmenően azt találtuk, hogy a TBI-on átesett patkányok MCA-iban a H_2O_2 szignifikánsan nagyobb dilatációt váltott ki, mint a kontroll állatok MCA-iban, valamint a dilatátor érválaszt gátolta a BK_{Ca} csatorna blokkoló paxillin. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TBI által indukált, fokozott termelődésű cerebrovaszkuláris H_2O_2 a BK_{Ca} csatornák aktiválása révén csökkenti az agyi erek myogén összehúzódását (13. ábra). Emellett azt találtuk, hogy a TBI fokozza a BK_{Ca} csatornák cerebrovaszkuláris mRNS expresszióját, ami valószínűleg megmagyarázza a csatornák fokozott értágító hatását TBI után.



13. ábra. A BK_{Ca} csatorna szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után. **A:** Paxillin (a kalcium-aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornák specifikus blokkolójának) hatása a kontroll és TBI patkányokból izolált arteria cerebri media-k (MCA) nyomás által kiváltott myogén válasza (n=5 minden csoportban, **p*<0,05 vs. kontroll; #*p*<0,05 vs. TBI). **B:** A BK_{Ca}-csatornák blokkolása paxillinnel gátolja az MCA-k H₂O₂ által kiváltott dózisfüggő dilatációját kontroll és TBI-s patkányokban. H₂O₂ által kiváltott dilatáció szignifikánsan nagyobb traumás állatok MCA-iban (n=5 csoportonként; **p*<0,05 vs. kontroll, #*p*<0,05 vs. TBI).

A TRPV4 szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után

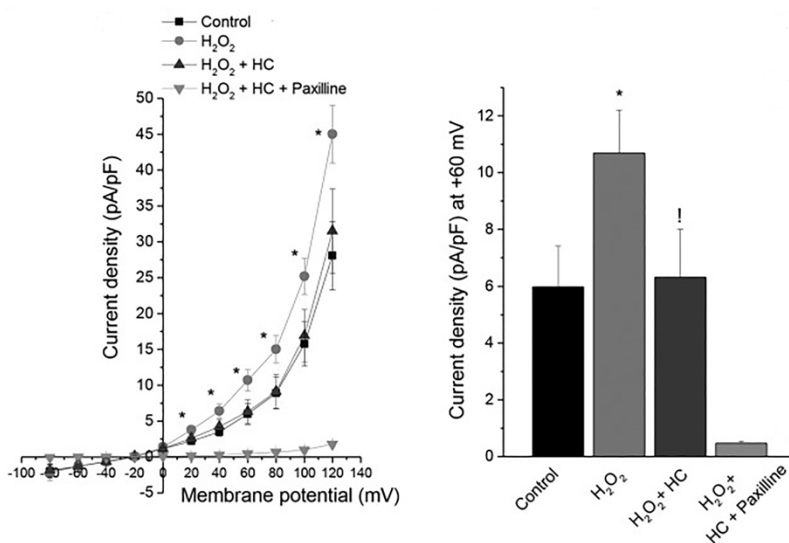
Elsőként demonstráltuk, hogy agyi erek TBI után csökkent myogén válasza visszaáll a kontroll szintre a HC067047, a TRPV4-csatornák specifikus blokkolója jelenlétében. Az MCA-k H₂O₂ által kiváltott dilatációja csökkent HC067047 jelenlétében, arra utalva, hogy a H₂O₂ által kiváltott dilatációt a TRPV4 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. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a TBI-t követően a myogén konstriktó gyengülésében a TRPV4 csatorna aktivációja részt vesz, a TRPV4-et a H₂O₂ aktiválni képes, valamint a TRPV4 hatásában a BK_{Ca} csatorna szintén szerepet játszik (14. ábra). A TBI szignifikánsan fokozta a TRPV4 gén cerebrovaszkuláris mRNS expresszióját, ami valószínűleg megmagyarázza a TRPV4 agonista által indukált fokozott dilatátor érválaszt koponya trauma után.



14. ábra. A TRPV4 csatorna szerepe agyi artériák károsodott myogén konstriktójában súlyos agysérülés után. (A) HC067047 (a TRPV4 csatornák specifikus blokkolójának) hatása a kontroll és TBI patkányokból izolált arteria cerebri media-k (MCA) nyomás által kiváltott myogén válaszaira (n=5 minden csoportban, **p*<0,05 vs. kontroll; # *p* <0,05 vs. TBI). A B panel a TRPV4 csatorna blokkoló HC067047 hatását mutatja kontroll és TBI patkányok MCA-inak H₂O₂ által kiváltott dilatációjára. C: BK_{Ca} csatornák blokkolásának hatása a TRPV4 agonista GSK1016790A által kiváltott MCA dilatációra (fontos kiemelni, hogy mind a H₂O₂-indukált, mind a GSK1016790A által kiváltott dilatáció szignifikánsan magasabb TBI után) (n = 5 csoportonként, **p* < 0,05 vs. Kontroll; #*p* < 0,05 versus TBI).

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

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 VSCM-eken szignifikánsan növelte a BK_{Ca} áramot, amit a TRPV4 csatornák gátlása megszüntetett (15. ábra).



15. 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

Jelen vizsgálataink kimutatták, hogy súlyos, diffúz koponya-agy sérülés károsítja az agyi artériák myogén konstriktóját. Ezen eredményeink az irodalmi eredményekkel együtt (Golding és mtsai. „controlled cortical impact” modellt, Villalba és mtsai. pedig „fluid percussion modellt használtak) [119, 121] arra utalnak, hogy a myogén mechanizmus károsodása az alkalmazott állatmodellektől függetlenül a TBI következménye és a behatást követően szubakutan alakul ki. Az autoreguláció myogén mechanizmusának károsodása fontos szerepet játszhat az agyszövet másodlagos károsodásának kialakulásában. Először is, hozzájárulhat a vértérfogat növekedéséhez a zárt koponyában. Másodsor, amikor a vérnyomás növekszik, a myogén védelem hiánya valószínűleg lehetővé teszi a magas nyomás propagációját az agyi mikrocirkulációba, ami elősegíti a vér-agy gát TBI-indukálta károsodását, ami fokozza a vazogén ödéma kialakulását. Mind a megnövekedett vérvolumen, mind a vazogén ödéma hozzájárul a koponyaűri nyomás emelkedéséhez, különösen akkor, ha az intracraniális compliance a citotoxikus ödéma miatt eleve csökkent [19, 33, 113, 114, 132].

A fenti eredmények elsőként demonstrálták, hogy súlyos TBI után a vaszkuláris simaizom sejtekben történő mitokondriális szabadgyök termelődés [124, 133] központi szerepet játszik az agyi artériák károsodott myogén összehúzódásában. A TBI-által indukált, a mitokondriális oxidatív stresszhez vezető folyamatok nem tisztáztak, de szerepe lehet mechanoszenzitív mtROS termelésnek [134, 135], a sérült agyi parenchymából felszabaduló tényezőknek (beleértve a glutamát neurotoxicitást) [136-138] és/vagy humorális tényezőknek [139, 140]. A mitokondriális szabadgyök termelődésben az elektrontranszport lánc I. és III. komplexe kiemelt szerepet játszik [141, 142]. Specifikus inhibitorok használatával a jövőben tisztázni kell, hogy a TBI miként befolyásolja a ROS képződést ezeken a pontokon.

A mitokondriális szuperoxidot a vaszkuláris simaizom sejtekben is expresszálódó manganáz szuperoxid-dizmutáz (MnSOD) alakítja H_2O_2 -vé [124, 143-146]. A H_2O_2 -ra a mitokondriális membránok jelentős permeabilitást mutatnak, azokon áthaladva a termelődést követően a simaizom sejtek citoszoljában a vazodilatátor H_2O_2 szintje emelkedik [125]. Eredményeink, melyek szerint H_2O_2 -t bontó kataláz helyreállítja a TBI-s patkányokból származó MCA-k myogén válaszait, kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozólag, hogy a mitokondriumokból származó megnövekedett H_2O_2 szint kulcsszerepet játszik a diffúz agyi trauma utáni artériás myogén összehúzódás diszregulációjában. A legújabb tanulmányok felvetik annak lehetőségét, hogy a nitrogén-monoxid szintézis aktiválása szintén hozzájárulhat a TBI utáni csökkent myogén összehúzódáshoz [121]. Mivel az endotheliális NO és a mitokondriumokból származó H_2O_2 interakcióba léphet egymással [147, 148], jövőbeni

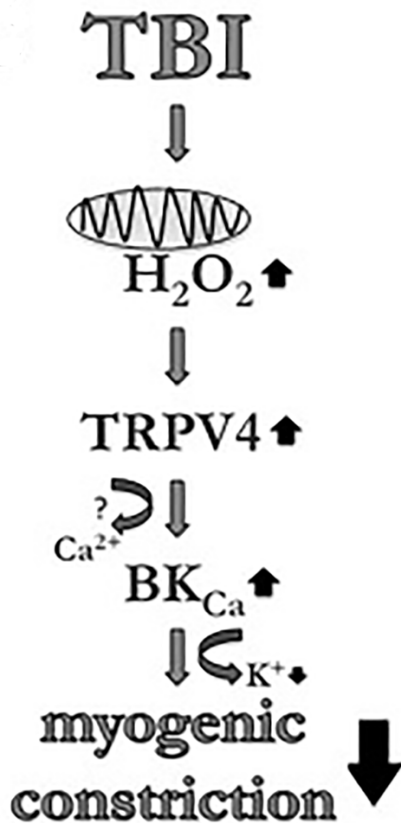
tanulmányoknak fel kell mérnie, hogy a TBI-indukálta endotheliális károsodás miként modulálhatja agyi erek myogén tónusát.

Korábbi eredmények kimutatták, hogy a vaszkuláris simaizom sejtek Ca^{2+} -aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornái a nyomás-indukálta myogén konstriktió negatív visszacsatolású szabályozói az által, hogy a simaizomsejtek hiperpolarizációján keresztül gátolják a feszültségérzékeny kalcium csatornák aktiválódását [126-128]. Szintén ismert, hogy a H_2O_2 -által okozott agyi vazodilatációban a Ca^{2+} -aktivált kálium (BK_{Ca}) csatornák szerepet játszhatnak [130, 131]. Ezen eredményekkel összhangban 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 H_2O_2 nem váltott ki vazodilatációt. Szintén, a H_2O_2 szignifikánsan megnövelte a BK_{Ca} csatorna aktivitását vaszkuláris simaizomsejteken. Mindezek azt sugallják, hogy TBI után a mitokondriumokból származó H_2O_2 a BK_{Ca} csatornák aktivációján keresztül csökkenti az agyi erek myogén konstriktióját.

A vaszkuláris simaizom sejtek BK_{Ca} csatornáinak aktivitását a szarkoplazmás retikulumból felszabaduló mikroszkópikus Ca^{2+} spark-ok szabályozzák, melyek felszabadulási frekvenciáját és amplitúdóját a H_2O_2 befolyásolja [149]. A vanilloid családba tartozó 4-es típusú tranziens receptor csatornák (TRPV4) mechanoszenzitív, nem szelektív kationcsatornák, amelyek fontos szerepet játszanak a cerebrális vazomotor tónus fenntartásában [129] és a simaizom sejtekben detektált Ca^{2+} spark-ok kialakulásában is [150]. Ezen összefüggések kórtani jelentőségét tárták fel eredményeink, melyek szerint a TRPV4 csatornák szelektív blokkolása gátolja a H_2O_2 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 H_2O_2 a BK_{Ca} csatornákat TRPV4 csatornákon keresztül aktiválja. Ennek az elképzelésnek közvetlen kísérleti bizonyítékát adják eredményeink, amelyek szerint izolált cerebrovaszkuláris simaizom sejteken a H_2O_2 által kiváltott BK_{Ca} -áramot a TRPV4-blokkoló HC067047 gátolja.

Összefoglalva kimutattuk, hogy súlyos diffúz koponya-agy sérülést követően patkányban fokozott cerebrovaszkuláris mitokondriális H_2O_2 termelés alakul ki, ami vanilloid típusú tranziens receptor csatornák (TRPV4)-on keresztül aktiválja a vaszkuláris simaizom sejtek Ca^{2+} -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 (16. ábra).



16. ábra. Az agyi rezisztencia erek károsodott myogén konstriktójának mechanizmusa traumás agykárosodás után. Traumás agykárosodás (TBI) után főként mitokondriális eredetű H₂O₂ túlzott cerebrovaszkuláris termelése alakul ki. A H₂O₂ aktiválja a cerebrovaszkuláris simaizomsejtek tranziens receptor potencál vanilloid 4 (TRPV4) csatornáit, amik a kalcium-indukálta kálium (BK_{Ca}) csatornák aktiválásával a simaizomsejtek membránjának hyperpolarizációjához és az agyi erek ezt követő dilatációjához vezetnek, ami csökkenti a nyomás által kiváltott myogén összehúzódást. A myogén konstriktó károsodása központi szerepet játszik a TBI-indukálta autoregulációs diszfunkcióban.

A fentiekben bemutattam, hogy súlyos koponya traumát követően a mitokondriális oxidatív stressz központi szerepet játszik agyi erek myogén autoregulációs diszfunkciójában. Az alábbiakban ennek lehetséges farmakológiai csökkentését szeretném demonstrálni a leggyakoribb TBI típus, az enyhe koponya-agy sérülés, valamint a leggyakoribb cerebrovaszkuláris rizikó tényező, a hipertónia közös állatmodellje segítségével.

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 [151]. A TBI-ben leggyakrabban azonosított komorbid állapot a hipertónia [152, 153], aminek jelentőségét aláhúzza, hogy kísérleti állatokban a magasvérnyomás fokozta a TBI-t követő mortalitást [154].

Amint az fent kimutattuk, a TBI-által okozott cerebrovaszkuláris diszfunkcióban, és minden bizonnyal a másodlagos agykárosodásban, központi szerepet játszik a cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz [106, 155]. TBI-t követően a mitokondriális folyamatok mellett, de azokkal szoros összefüggést mutatva a szabadgyökök fontos forrása lehet a plasmamembránhoz asszociált NADPH-oxidáz. Ezt támogatja, hogy TBI-t követően a NADPH-oxidáz *Nox4* alegysége fokozott expressziót mutat, valamint a TBI-hoz kapcsolt NMDA receptor aktiváció az enzim fokozott működéséhez vezet [156].

A leggyakoribb TBI típus, az enyhe koponya trauma (mild-mTBI) után ugyan a szabadgyökök termelésének csak átmeneti növekedését mutatták ki [157], ennek szerepe lehet hosszú távú cerebrovaszkuláris és neuronális eltérésekben. A magas vérnyomásról ismert, hogy önmagában illetve más kórállapotokkal szinergizálva, fokozza a cerebrovaszkuláris oxidatív stresszt [158], például az öregedés által kiváltott mitokondriális oxidatív stresszt egerek agyi artériáiban [159]. Ezek alapján 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.

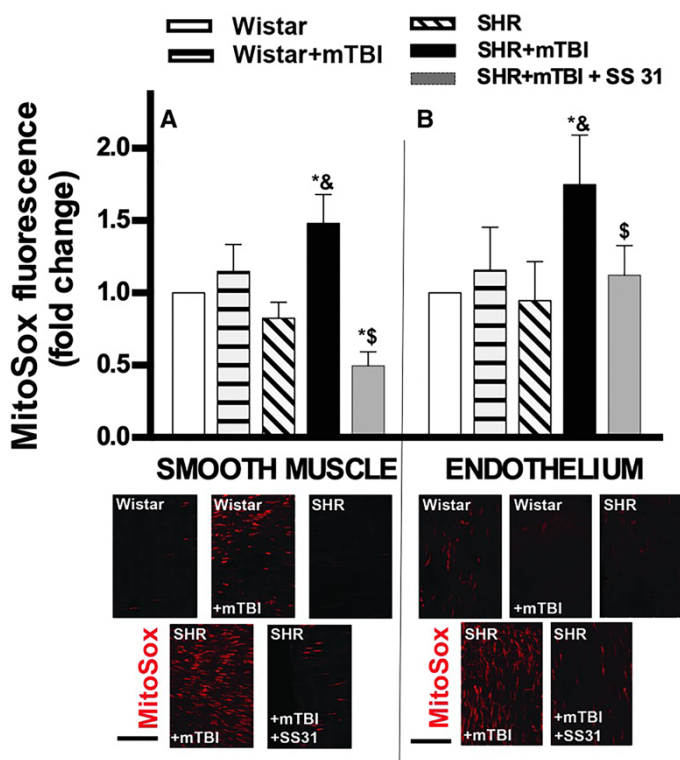
Hipotéziseink tesztelése céljából enyhe TBI-t indukáltunk normotenzív Wistar és spontán hipertóniás (SHR) patkányokban. A celluláris oxidatív stresszt arteria cerebri media (MCA) izolált szegmenseiben vizsgáltuk dihidroetidium (DHE) fluoreszcens festékkel. Az mtROS termelést a mitokondrium-specifikus 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 [160].

Eredmények

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

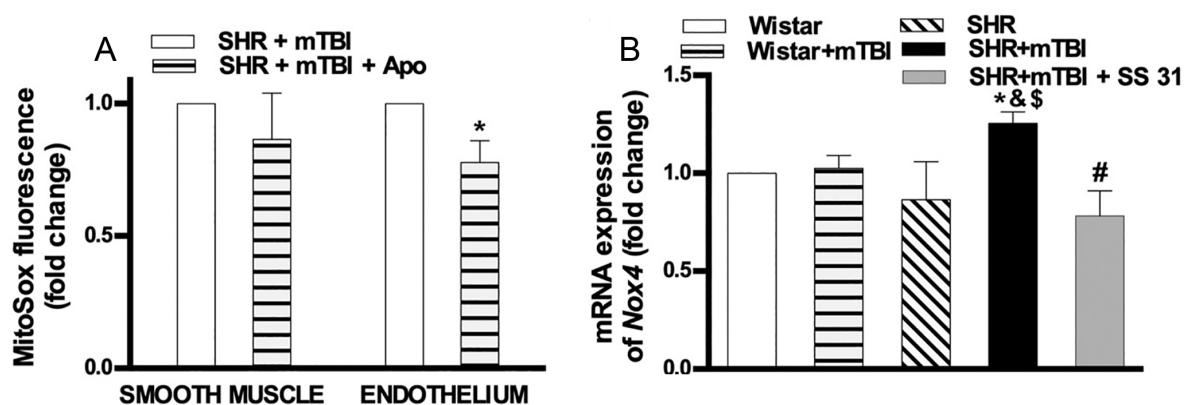
Az SHR-ek vérnyomása szignifikánsan magasabb volt, mint a normotenzív patkányoknak (Wistar: 109 ± 3 Hgmm, SHR: 183 ± 3 Hgmm), amire sem az enyhe traumás agysérülés, sem az SS-31 kezelés nem volt hatással. Két héttel az mTBI után a hipertóniás patkányok agyi ereinek simaizom és endothel rétegében egyaránt 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 (17. ábra).



17. ábra. Enyhe traumás agysérülés (mTBI) tartós mitokondriális oxidatív stresszt indukál hipertóniás patkányok agyi artériáiban, amit SS-31-gyel végzett kezelés visszafordít. MitoSox fluoreszcencia (ami a mitokondriális reaktív szabadgyök (ROS) képződést jelzi) normotenzív (Wistar), valamint hipertóniás patkányok (SHR) arteria cerebri media (MCA)-iban 2 héttel mTBI után, és SS-31 célzott mitokondriális antioxidáns peptiddel történő kezelés végén ($n=5$ minden csoportban, $*p < 0,05$ vs. Wistar, $\#p < 0,05$ vs. Wistar + mTBI, $\&p < 0,05$ versus SHR, $\$p < 0,05$ versus SHR + mTBI). Az alsó panelen a vörös DHE fluoreszcencia reprezentatív konfokális képei láthatók.

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 mRNA 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 (18. ábra).



18. ábra. A NADPH-oxidáz szerepe az enyhe traumás agysérülés (mTBI) által kiváltott tartós mitokondriális oxidatív stresszben hipertóniás patkányok agyi artériáiban. **A:** MitoSox fluoreszcencia összegzett adatai arteria cerebri media (MCA) simaizom- és endotheliális rétegeiben spontán hipertóniás patkányokban (SHR) 2 héttel mTBI után NADPH-oxidáz inhibitor apocinin (Apo) hiányában és jelenlétében (n = 5 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. SHR + mTBI). **B:** A NADPH-oxidáz *Nox4* alegységének mRNA expressziója normotenzív (Wistar), valamint hipertóniás patkányok (SHR) arteria cerebri mediaiban (MCA) 2 héttel mTBI után, és SS-31 célzott mitokondriális antioxidáns peptiddel történő kezelés végén (n = 5 csoportonként, * $p < 0,05$ versus Wistar, & $p < 0,05$ versus Wistar + mTBI, \$ $p < 0,05$ versus SHR, # $p < 0,05$ versus SHR + mTBI).

Megbeszélés

Társbetegségek hiányában egyszeri enyhe koponya-agy sérülés, ellentétben a súlyos vagy ismétlődő enyhe TBI-vel, csak átmenetileg fokozza a ROS-termelést az agyban, ami az agyi véráramlás-szabályozás és kognitív funkciók átmeneti zavarához vezethet [161, 162]. A fent bemutatott egyik legfontosabb eredményünk, hogy meglévő komorbid hipertónia jelenlétében egyetlen enyhe traumás agysérülés elegendő, hogy tartós oxidatív stresszt idézzen

elő az agy 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 [163], csökkentheti az agyi bazális véráramlást [164] és elősegítheti a neurovaszkuláris szét-kapcsolást [165]; ezek mindegyike hozzá járulhat kognitív diszfunkció kialakulásához. Eredményeinknek kiemelt transzlációs relevanciája van: az mTBI valószínűleg károsabb következményekkel jár hipertóniás betegekben, mint normotenziós 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. Ezt támogatja, hogy kétirányú aktivációs kapcsolat lehetséges a NADPH-oxidáz általi ROS-termelés és az mtROS-termelés között [166]. A mitokondriális membránhoz kapcsolt *Nox4* alegység mechanikai erők hatására aktiválható [167], aktiválódása pedig mitokondriális oxidatív stresszt indukál [168]. Ezen mechanizmus jelentőségét mutatják azon eredmények, melyek szerint a *Nox4* deléciója [169] és a NADPH-oxidáz inhibitor apocinin [170, 171] 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* cerebrovaszkuláris expressziója tartósan megnövekedett az SHR-ekben mTBI után, amit a mitokondriális oxidatív stressz célzott gátlása SS-31-gyel visszafordított. Az mTBI és a magas vérnyomás kölcsönhatása a cerebrovaszkuláris mitokondriális oxidatív stressz indukálásában egyéb mechanoszenzitív utakat is érinthet (pl. integrin által közvetített jelátvitel, Ca^{2+} jelátvitel, PKC, Rho kinázok és MAP kinázok aktiválása stb.) [134]. Ezek tisztázásán túl a jövőben fel kell tárni a mechanoszenzitív mtROS termelés helyeit. A lehetséges helyek közé tartozik az I. komplex, amely az NADH elektronjainak belépési pontja a légzési láncba, és a III. komplex, amely az elektronokat a citokróm c-hez juttatja. A mitokondriális O_2 diszmutálódhat H_2O_2 -vé [172], amely átdiffundálva a mitokondriális membránon elősegítheti a további ROS termelést a citoplazmában, például az eNOS szétkapcsolásával [173].

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 az értekezésben 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 [160] idős korban, valamint agyi erek autoregulációs diszfunkciójával traumás agysérülés után.

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 értekezés agyi erek myogén autoregulációs funkciójának eltéréseit bemutató fejezeteiben tárgyaltam, hogy a krónikus magas vérnyomás a 20-HETE/TRPC6 útvonal fokozott aktivitásán keresztül az agyi artériák fokozott nyomás-indukálta myogén konstriktóját 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 konstriktójának 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 rizikófaktora a magas vérnyomás [174, 175], ami a TBI-indukálta másodlagos agysérülés exacerbációját okozhatja és a TBI fokozott mortalitásával jár [176-178].

A nyomás-indukálta kóros konstriktor és dilatátor cerebrovaszkuláris útvonalak interakciójának vizsgálata céljából krónikus magasvérnyomásos patkányokban súlyos koponya traumát idéztünk elő, majd izolált agyi artériák myogén válaszait összehasonlítottuk normotenzív, valamint traumát el nem szenvedett állatok agyi érválaszaival.

Eredmények

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

A spontán hipertóniás patkányokban (SHR) (traumás agysérüléssel (TBI) és anélkül is) szignifikánsan magasabb szisztolés vérnyomásértékeket mértünk, mint a kontroll állatokban

(WKY). Irodalmi adatokkal és korábbi eredményeinkkel [19, 89] összhangban a hipertóniás patkányok artéria cerebri media (MCA) izolált szegmentumainak myogén konstriktója 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 szegmenteik myogén válaszai hipertóniás patkányokban TBI után fokozottak maradtak (nem különböztek a kontroll, traumán át nem esett SHR-ekből származó MCA-k myogén összehúzóódásaitól). Az MCA-k konstriktor válaszai U46619 tromboxán A2 agonistával szemben nem különböztek szignifikánsan a csoportok között (19. ábra).

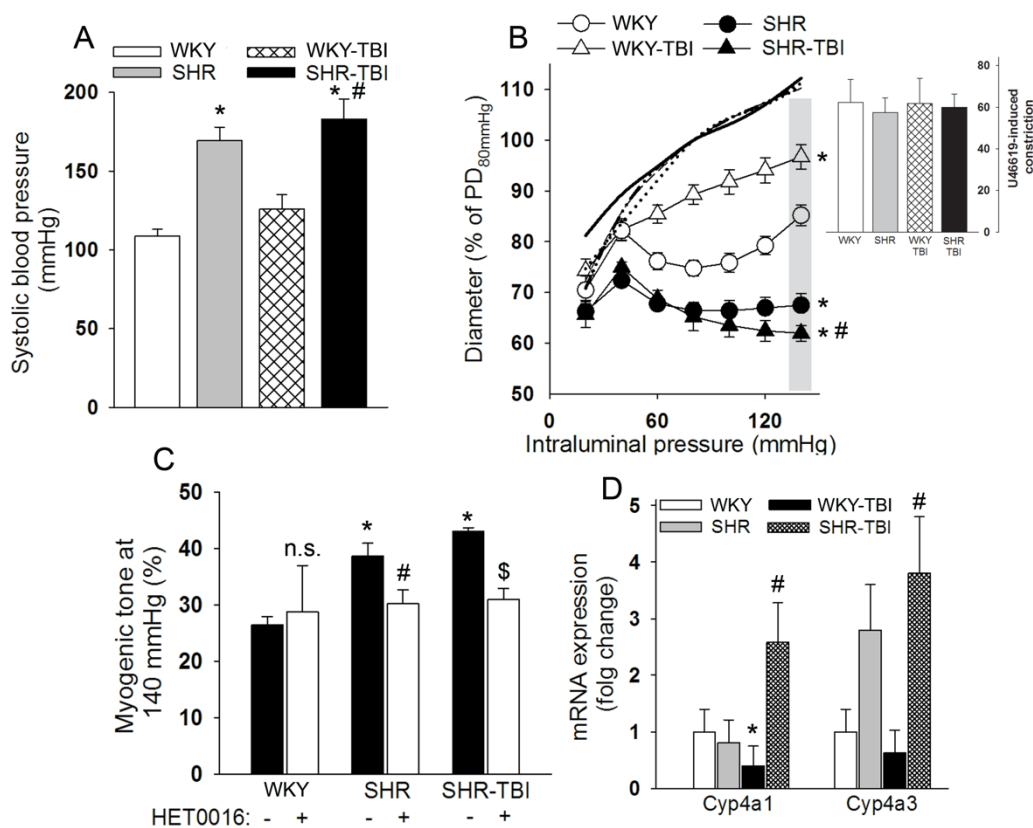
A 20-HETE szerepe a hipertónia-indukálta fokozott cerebrovaszkuláris myogén tónusban súlyos traumás agykárosodás után

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 (19. ábra).

Megbeszélés

Az értekezés 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 hátterében a magas vérnyomás által indukált fokozott cerebrovaszkuláris citokróm P450 ω -hidroxiláz expresszió és fokozott 20-HETE termelődés állhat [19, 179, 180]. 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 [181], 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.



19. 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 cytochróm 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 cytochróm P450 Cyp4a1 és Cyp4a3 izoformák mRNS expressziója a fenti állatcsoportok MCA-iban (n=5 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs.TBI).

IV. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása: preklinikai modellektől az emberig

IV.1. A neurovaszkuláris kapcsolás szerepe a kognitív funkcióban

Bevezetés

Egyre több kísérletes bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a nagyobb agyi artériákat érintő kórképek (pl. agyi ischémiához vezető atherosclerosis) mellett az agyi mikrokeringés patofiziológiás változásai is kritikus szerepet játszanak az agyműködés pl. életkorral összefüggő hanyatlásában [182]. Ezek közül kiemelt jelentőségűek a neurovaszkuláris egység funkcionális változásai, amelyek meghatározzák az agyi véráramlás lokális szabályozását. Mint már többször említettem, a neuronok energiaigénye nagy, az agynak pedig kevés tartalékkapacitása van. A megnövekedett neuronális aktivitás kiszolgálása miatt szükség van az oxigén- és glükózzsállítás időben és regionálisan illesztett, gyors növekedésére. Ezt egy „feed-forward” elven működő mechanizmus, a neurovaszkuláris kapcsolás biztosítja [56]. A kialakuló funkcionális hiperémia felelős az aktív agyi terület megnövekedett oxigén és glükóz igényének kielégítéséért, a káros anyagok hatékony eltávolításáért és az optimális mikrokörnyezet biztosításáért az agyszövetben. A neurovaszkuláris kapcsolás az aktivált neuronok és astrocyták, valamint az ér endothélséjtek, pericyták és simaizomsejtek közötti összehangolt, szigorúan szabályozott intercelluláris kommunikáció révén jön létre [56]. A neurovaszkuláris kapcsolás létrehozásában központi szerepet játszik a neuronális aktiváció által kiváltott neurális és endotheliális nitrogén-monoxid (NO) termelés [59, 62, 183], valamint az aktivált perivaszkuláris astrocytákból felszabaduló dilatátor arachidonsav metabolitok: epoxygenázok által termelt epoxyeikozatrién-savak (EET) és cyclooxygenáz eredetű prosztaglandinok [184-186].

Az NO, EET-k és prosztaglandinok kóros termelése és/vagy felszabadulása miatti neurovaszkuláris károsodást (szét-kapcsolást) többféle kórkép állatmodelljében, valamint betegekben is demonstrálták [76, 77, 163]. Központi szerepét feltételezik a kognitív károsodás kialakulásában öregedésben, elhízásban [187], hipertóniában [188], Alzheimer-kórban [189]. 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 (szinaptikus diszfunkciót, a neurotranszmitter receptorok és a poszt- szinaptikus jelátviteli utak diszregulációját, károsodott celluláris metabolizmust, fokozott neuroinflammációt és az amyloid plakkok neurodegeneratív

következményeit), amelyek károsító hatást fejtenek ki a magasabb kérgi funkcióban részt vevő folyamatokra [190]. Ennek megfelelően az említett betegségek modelljeiben végzett vizsgálatok során kihívást jelentett a neurovaszkuláris szét-kapcsolás specifikus szerepének megállapítása a kognitív károsodás kialakulásában.

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.

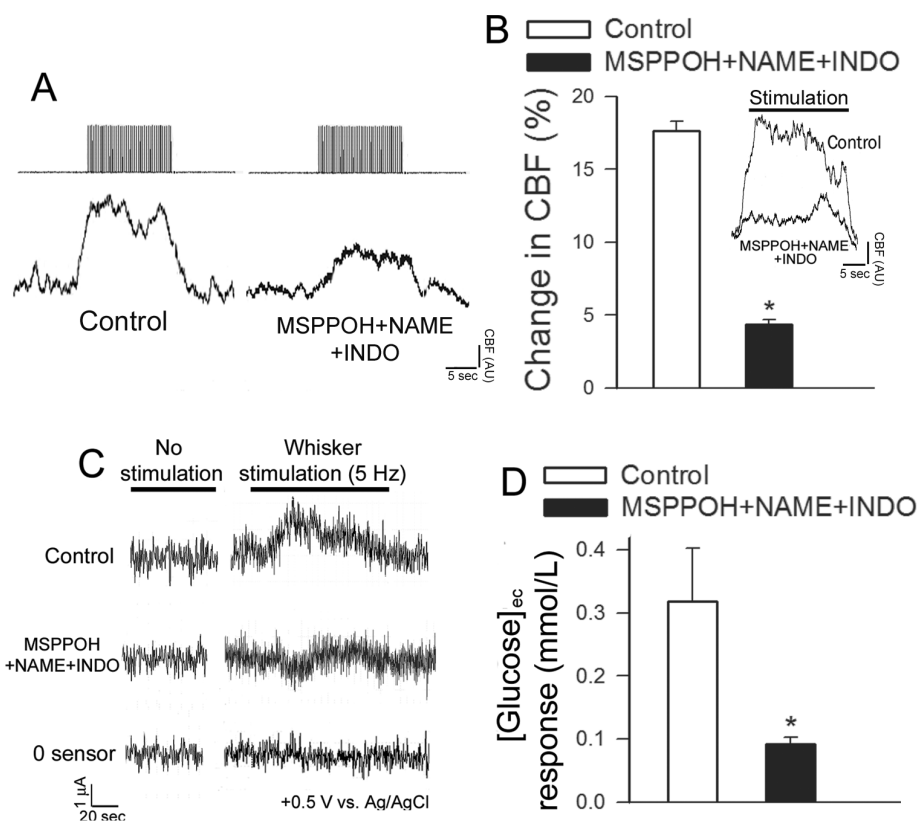
Eredmények

A neurovaszkuláris szét-kapcsolás állat modellje

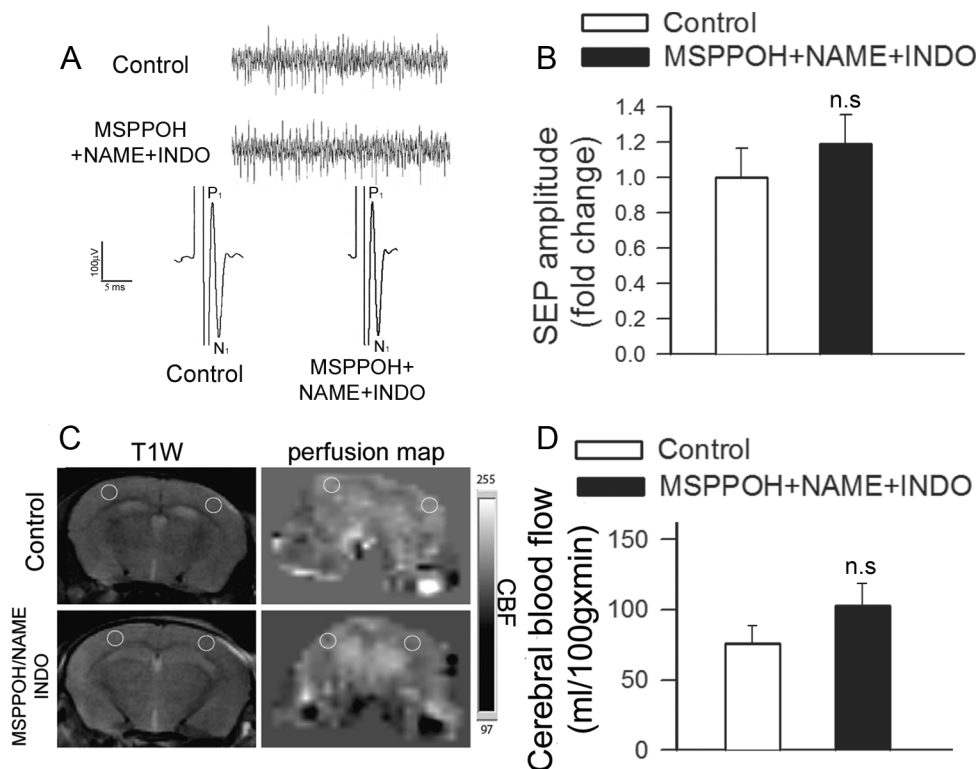
Fiatal egészséges egerekben az NO, EET és prosztaglandin szintézis gátló szereivel történő szisztémás kezelést követően (a gátlószerek rövidítése alapján MSPPOH+NAME+INDO) a bajusz-stimuláció által kiváltott véráramlás növekedés a kontralaterális somatoszenzoros kéregben szignifikánsan csökkent a vivő anyaggal kezelt állatok válaszaikhoz képest. Az MSPPOH+NAME+INDO topikális, koponya-ablakon keresztüli alkalmazása hasonló eredményeket mutatott. A véráramlás növekedéssel párhuzamosan a szomatoszenzoros kéregben a neurális aktiváció során az extracelluláris glükóz koncentrációja szintén megemelkedett, ami szignifikánsan csökkent az MSPPOH+NAME+INDO-vel kezelt állatokban. A neurovaszkuláris szét-kapcsolást indukáló farmakológiai kezelés nem okozott szisztémás hemodinamikai eltéréseket. Ennek megfelelően a két állatcsoport vérnyomása nem különbözött szignifikánsan (kontroll: 106 ± 2 Hgmm; MSPPOH+NAME+INDO kezelt: 107 ± 3 Hgmm; $p=0,49$). A bazális agyi véráramlást (CBF) a szomatoszenzoros kéregnek megfelelően (coronálisan a bregmától 1-1,5 mm-re caudálisan) 7T térerejű kisállat MRI segítségével, arterial spin labeling szekvenciával határoztuk meg. Azt találtuk, hogy a számított CBF értékek nem különböztek a kontroll és az MSPPOH+NAME+INDO csoport között.

A spontán idegi aktivitást és a kiváltott neuronális válaszokat *in vivo* vizsgáltuk annak meghatározására, hogy az alkalmazott kezelés befolyásolja-e a szomatoszenzoros kéreg neuronális működését. 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.



20. ábra. Kísérletesen indukált neurovaszkuláris szét-kapcsolás egerekben. (A) Az agyi véráramlás (CBF) reprezentatív kísérletes regisztrátuma laser Doppler szenzorral 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)-benzolhexánamid (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 mérve MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek szomatoszenzoros kérgében glükóz bioszenzorral. „0 szenzor”: a glükóz szenzorral 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).

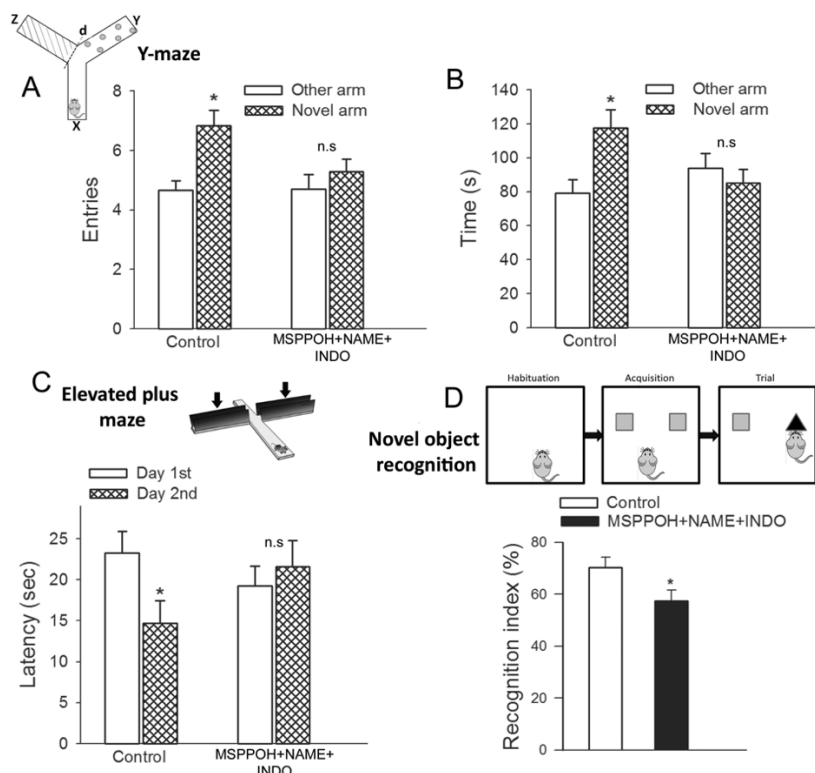


21. ábra. Kísérletesen indukált neurovaszkuláris szét-kapcsolás nem érinti a neuronális funkciót és a bazális agyi véráramlást. **A:** Bajusz-párna elektromos stimulációja által kiváltott szomatoszenzoros kiváltott potenciál (SEP) válaszok kísérletes regisztrátumai MSPPOH+NAME+INDO kezelt, valamint kontroll egerek szomatoszenzoros kérgében. A kiváltott válaszok (P1 és N1 amplitúdó csúcsok) fölött a spontán corticális elektromos aktivitás regisztrátumai láthatók. **(B)** A negatív hullámok (N1) amplitúdóját nem befolyásolta sem az MSPPOH+NAME+INDO akut topikális koponyaablakon keresztüli adása, ($n=6$, $p=0,2$), sem az egerek krónikus kezelése MSPPOH+NAME+INDO-val (kontroll: $n=9$, kezelt: $n=6$, $p=0,4$). **(C)** A T1 súlyozott MRI-felvételek és a megfelelő perfúziós térképek egy kontroll és egy MSPPOH+NAME+INDO kezelt egér agyából. A bemutatott szelet a bregmától 1-1,5 mm-re caudálisan helyezkedik el, a sárga körök a szomatoszenzoros kéregre helyezett régiókat (ROI) mutatják, amelyekben az agyi véráramlást (CBF, mL/100 g min) mértük. A bazális perfúzióra vonatkozó összefoglaló adatokat ($n=10$ minden csoportban) a **(D)** mutatja ($p=0,139$).

A neurovaszkuláris szét-kapcsolást követően kognitív funkció zavar alakul ki

A hippocampus-függő térbeli memóriát felmérve azt találtuk, hogy a neurovaszkuláris szét-kapcsolás a térbeli munkamemória károsodásához és az újdonságkereső magatartás csökkenéséhez vezet (a teszt pontos leírását ld. a Módszer fejezetben). 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 hippocampális tanulást is felmértük az „elevated plus maze” tanulási protokolljával. 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 két különböző tárggyal (az egyik új, a másik ismerős) végzett kísérleti szakaszban 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 (22. ábra).



22. ábra. A neurovaszkuláris szét-kapcsolás a tanulás és a memória károsodását okozza. (A és B) Egerek térbeli memória tesztelése Y-maze-ben (sematikus kép a labirintuson kívüli jelekkel (x: kezdőkar, y: „másik” kar, z: új kar)). A kontroll állatok intakt térbeli memória 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 (részletek ld. a Módszer fejezetben). Az ismert és ismeretlen objektumok vizsgálata alapján számolt felismerési index (RI: az új objektum vizsgálatára fordított idő a teljes tárgyvizsgálathoz viszonyítva) szignifikánsan csökkent MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerekben (n=20 csoportonként, $*p<0,05$ vs. Kontroll). INDO: indomethacin; MSPPOH: N-(metil-szulfonil)-2-(2-propinil-oxi)-benzol-hexánamid; l-NAME: l-NG-Nitroarginin-metil-észter.

A neurovaszkuláris szét-kapcsolás hatása a szenzomotoros funkcióra és a járás-koordinációra

Rotarod tesztet használva azt találtuk, hogy az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek motoros teljesítménye romlott a kontroll egerekhez képest. Ezt a Rotarod forgó sávjaiból történő kiesésig eltelt idő szignifikáns csökkenése mutatja (a kiesés szignifikánsan kisebb sebességnél történt). A statikus szorító erő szintén szignifikánsan csökkent az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerekben. Ugyan csökkenő trendet mutattak, de a MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt állatok nem teljesítettek szignifikánsan rosszabbul az „adhesive removal test”-ben, valamint olfactorius teljesítményük és gusztatoros motivációjuk sem csökkent. A járás-koordináció a szenzomotoros rendszer magasabb szintű integrációs folyamata. Érdekes módon vizsgálatainkban nem figyeltünk meg különbséget a kontroll egerek és az MSPPOH+NAME+INDO-val kezelt egerek között a járást jelző paraméterekben (Regularitási index, Bazális szupport, Fázis diszperzió).

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

Annak megállapítására, hogy az MSPPOH+NAME+INDO-val végzett kezelés közvetlenül befolyásolja-e a tanulás és a memória alapját adó neuronális mechanizmusokat, a perforáns pálya 4x100 Hz-es tetániás stimulációját követően mértük hippocampális corticális szeletek gyrus dentatusában 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. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a két kísérleti csoport között nincs szignifikáns különbség a szinaptikus funkcióban, valamint a tanulás és memória neuronális mechanizmusában.

Megbeszélés

Epidemiológiai tanulmányok azt mutatják, hogy a cardio-cerebrovaszkuláris rizikó faktorok (ideértve az öregedést is) a késői kognitív hanyatlás jelentősen megnövekedett kockázatával járnak. Ezzel összhangban ismert, hogy az egészséges mikrovaszkuláris működés kritikus fontosságú a kognitív károsodás kialakulásának késleltetésében [191]. Ennek hátterében a vaszkuláris rizikófaktorok, a cerebro-mikrovaszkulátúra patológiás eltérései és a kognitív hanyatlás patogenezise közötti összetett kölcsönhatás állhat, amiben a neurovaszkuláris szét-kapcsolás valószínűleg kritikus szerepet játszik. Az általunk bemutatott állatmodellben az EET-k,

prostaglandinok és NO szintézisének farmakológiai gátlása neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz vezet, ami hasonlít a funkcionális hiperémia öregedés során megfigyelt károsodásához [163], valamint a magas vérnyomásban [188], elhízás során [187] vagy Alzheimer-kórban [189] látott neurovaszkuláris diszfunkcióhoz. A neurovaszkuláris szét-kapcsolás pathofiziológiai következményei valószínűleg sokrétűek. Eredményeink szerint a neurovaszkuláris szét-kapcsolás az agyi extracelluláris glükóz szint neuronális aktivációt követő csökkent növekedésével jár. Bár az extracelluláris glükóz szint abszolút értelemben vett viszonylag kis változásai valószínűleg nem állnak közvetlen összefüggésben a károsodott kérgi funkcióval, a károsodott hiperémiás válasz kóros metabolikus következményeire utalnak. Ennek megfelelően, korábbi tanulmányokkal [193, 194] összhangban, a károsodott neurovaszkuláris kapcsolás károsíthatja az aktív agyterület tápanyagellátást, a metabolikus melléktermékek nem megfelelő kimosódásához, és ezáltal megváltozott lokális mikroköznyezethez vezet, ami hátrányosan befolyásolja az idegsejtek funkcióját.

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 proszttaglandinok 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 [191, 192], 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 proszttaglandinok és EET-k termelését, és fokozza az arachidonsav vazokonstriktor metabolitjainak, például a 20-HETE-nek a termelését [163]. Az értágító arachidonsav metabolitok szintézisének károsodása szerepet játszik az IGF-1 hiányával összefüggő neurovaszkuláris szét-kapcsolásban is (ld. később). Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a mikrovaszkuláris egészséget elősegítő és a neurovaszkuláris kapcsolást javító terápiás beavatkozásoknak jótékony hatást kell gyakorolniuk a kognitív funkcióra. Másodszor, az értágító NO, EET-k és/vagy proszttaglandinok 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 [193, 194]. Harmadszor, 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 [194]. Lehetséges, hogy a neurovaszkuláris szét-kapcsolás funkcionális következményei regionális heterogenitást mutatnak, ennek megfelelően további vizsgálatokra van szükség annak bizonyítására, hogy a szomatoszenzoros kéregben látott eltérések kiterjednek-e más agyi területekre is. Lehetséges, hogy a neurovaszkuláris uncoupling funkcionális következményei regionális heterogenitást mutatnak, amelyet szintén jövőbeni vizsgálatoknak kell tisztázni. Kiváló klinikai tanulmányok mutatták be (pl. a MOBILIZE Boston-tanulmány[195]), hogy a neurovaszkuláris szét-kapcsolás járászavarral járhat. Vizsgálatainkban a kísérletileg kiváltott neurovaszkuláris szét-kapcsolás után nem sikerült szignifikáns változást kimutatni a járáskoordináció mutatóiban. Valószínű, hogy az akut neurovaszkuláris diszfunkció hatását a járás koordinációjára finomabb, érzékenyebb funkcionális tesztekkel lehet kimutatni: pl. a járás variabilitásának, a járási paraméterek lépésenkénti megváltozásának felmérésével. Ezt további tanulmányoknak kell tisztáznia.

Összefoglalva, 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 [75-78], ami (fenti eredményeink alapján is) valószínűleg hozzájárul a kérgi funkciók életkorral összefüggő hanyatlásához [195, 196]. Ennek megfelelően, az idős emberek és betegek neurovaszkuláris kapcsolását javító terápiás beavatkozások számos, életkorral összefüggő neurológiai diszfunkciót javíthatnak.

Mint már említettem, a neurovaszkuláris kapcsolás az aktivált neuronok, astrocyták, valamint az ér endothel- és simaizomsejtek összehangolt kölcsönhatásától függ. A neuronokból és astrocytákból származó jelek lokális vazodilatációt indukálnak, amiben a mikrovaszkuláris endothelsejtek nitrogén-monoxid (NO) termelése és annak felszabadulása központi szerepet játszik [62, 67, 68]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az öregedés a NADPH-oxidáz-eredetű reaktív oxigén gyökök (ROS) fokozott termelésével jár az agyi mikrovaszkulátúrában, ami, valószínűleg endothel diszfunkció kialakulásán keresztül, az NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenésével [75, 76, 189, 197] hozzájárul az idős egerekben látott neurovaszkuláris károsodáshoz [197]. 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 endothelvédő hatást fejt ki az aortában és a perifériás keringés ereiben mind az öregedés során, mind vaszkuláris rizikófaktorok jelenlétében [198-202]. Szintén ismert, hogy a resveratrol növeli az endothéliumból származó NO biohasznosulását, és gátolja a NADPH-oxidázokat a nagy erekben [199, 200, 203-205]. Korábbi tanulmányok szintén kimutatták, hogy a resveratrol jótékony hatással van a kognitív funkciók életkorfüggő hanyatlására [206, 207].

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

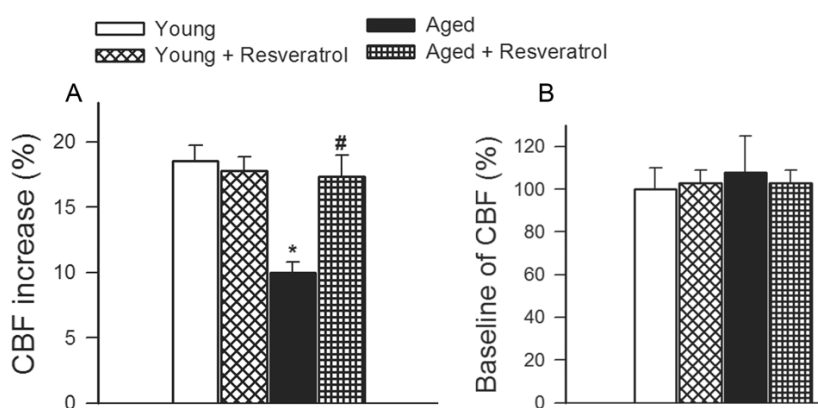
ROS termelésre és NADPH-oxidáz expressziójára gyakorolt hatását idős állatokból származó cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejtekben.

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 (23. ábra).

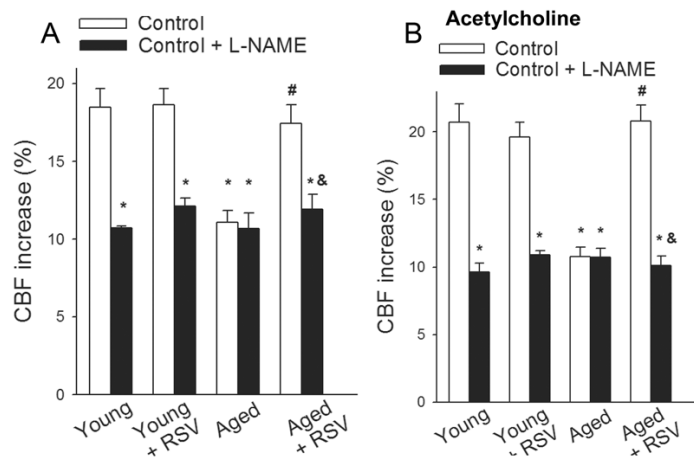
Fiatal állatokban az NO szintáz-inhibitor L-NAME (perfundált koponya ablakra történt topikális adása után) szignifikánsan csökkentette a bajusz-stimuláció által kiváltott véráramlás válaszokat a szomatoszenzoros kéregben, megszüntetve az életkor-indukálta különbséget. Idős állatokban az L-NAME beadása 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 (24. ábra).



23. ábra. A resveratrol kezelés visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerekben. 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). Ismert, hogy az ACh az endotheliális NO termelés stimulálásán és a neuronális muszkarin ACh receptorok aktiválásán keresztül fokozza a CBF-et [67, 68, 208]. Ennek megfelelően 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 (24. ábra). Az L-NAME és a muszkarin ACh-receptor antagonistá atropin együttes topikális adása minden kísérleti csoportban megszüntette a fennmaradó ACh által kiváltott CBF emelkedést. A simaizom sejteken vazodilatációt kiváltó adеноzin által indukált CBF válaszok (amelyek tehát nem függenek az endothelium működésétől) nem különböztek szignifikánsan a kísérleti csoportok között, és azokat nem befolyásolta az L-NAME, illetve az L-NAME és atropin adása.



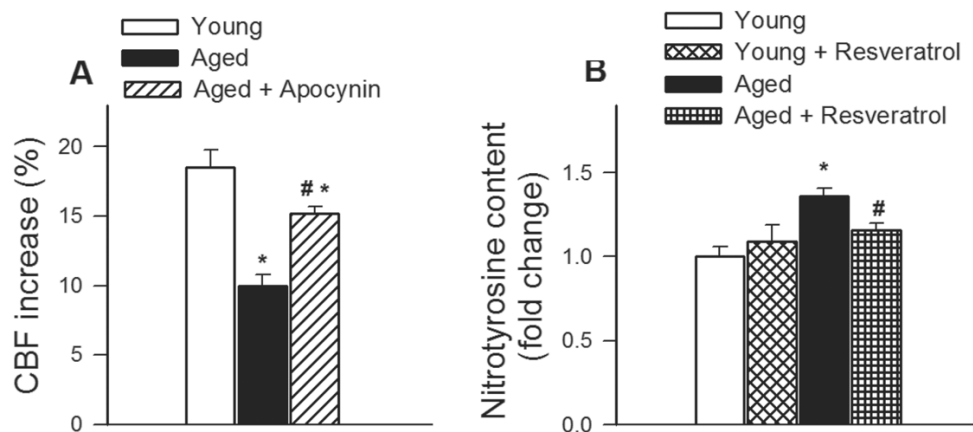
24. ábra. A resveratrol kezelés visszaállítja a nitrogén-monoxid (NO) által mediált neurovaszkuláris hiperémiát és az endothel-függő, acetil-kolin által kiváltott áramlás válaszokat idős egerekben. A szomatoszenzoros agyi véráramlás (CBF) változásai bajusz-párna-stimuláció (A) valamint az endothel-függő dilatátor acetil-kolin (B) hatására NO-szintáz inhibitor N ω -nitro-l-arginin-metil-észter (l-NAME) hiányában és jelenlétében a szomatoszenzoros kéregben kontroll és resveratrollal kezelt fiatal (Young, 3 hónap) és idős (Aged, 24 hónap) egerekben (n = 7-8 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged; & $p < 0,05$ vs. Aged + resveratrol).

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 apocinnal végzett topikális (koponya ablakon keresztül, az agykéregre közvetlenül adott) kezelés. Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy a NADPH-oxidáz által termelt reaktív szabadgyökök (ROS) központi szerepet játszanak az öregedés által kiváltott cerebro-mikrovaszkuláris diszfunkcióban (25. ábra).

A resveratrol kezelés csökkenti az öregedés által kiváltott oxidatív stresszt

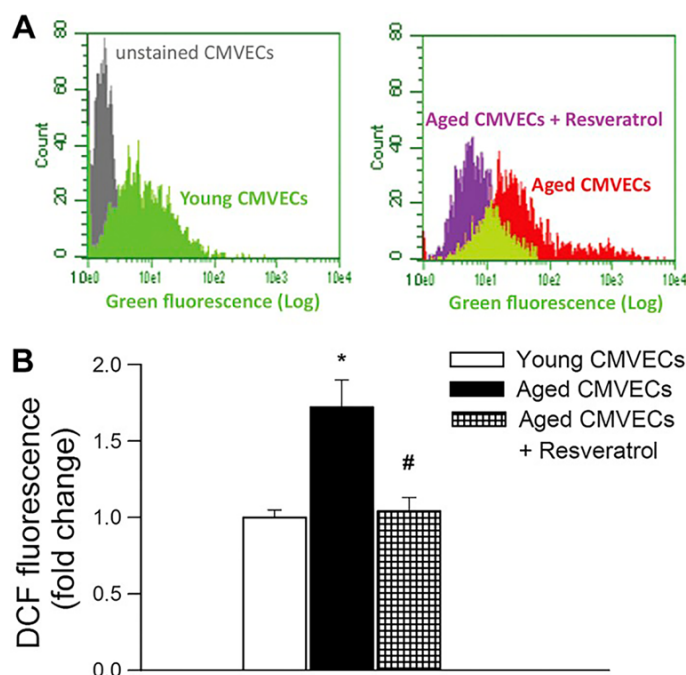
A kérgi agyszövet 3-nitrotirozin tartalma szignifikánsan megemelkedett idős egerekben, ami összhangban van az idős agy leírt, fokozott oxidatív/nitrozatív stresszével [209, 210]. Resveratrol-kezelést követően az idős egerek agyszövetében szignifikánsan csökkent a 3-nitrotirozin szint, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a resveratrol antioxidáns hatásai központi szerepet játszanak az öregedéssel járó mikrovaszkuláris védőhatásában (25. ábra).



25. ábra. NADPH-oxidáz inhibitor apocinin visszafordítja a neurovaszkuláris diszfunkciót, valamint a resveratrol-kezelés csökkenti az oxidatív stresszt idős egerekben. A: A NADPH-oxidáz inhibitor apocinin topikális adása javítja a bajusz-stimuláció által kiváltott agyi véráramlás (CBF)-válaszokat idős (Aged, 24 hónap) egerekben. A CBF válaszokat fiatal (Young, 3 hónap) egerekben összehasonlítás céljából mutatom be (n = 6 csoportonként) * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged). B: cortikális 3-nitrotirozin szintje fiatal és idős egerekben resveratrol kezelés után (n = 6 csoportonként, * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged).

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

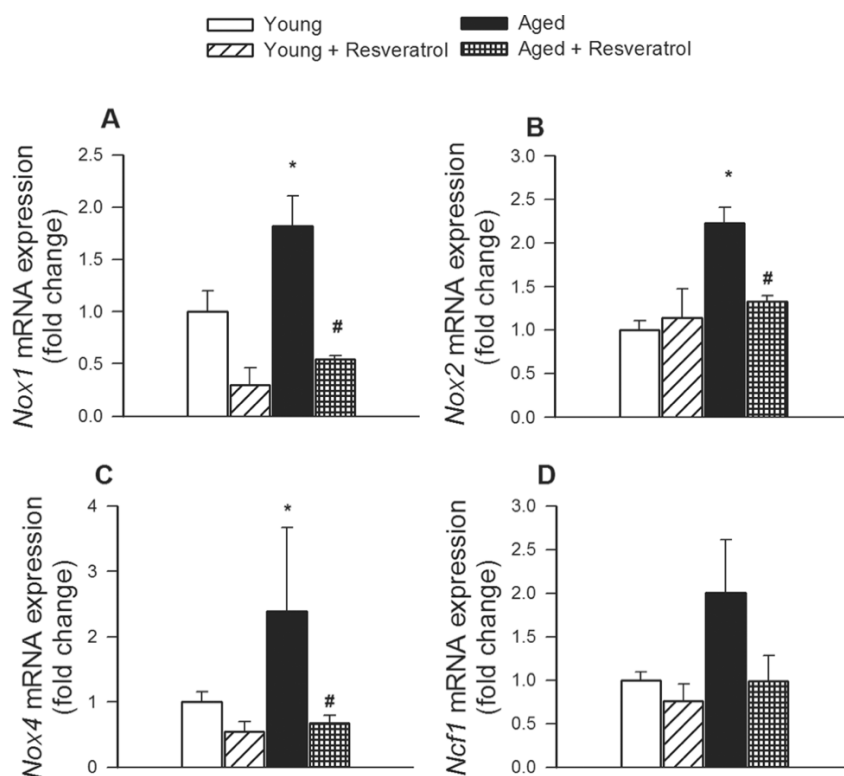
A resveratrol cerebrovaszkuláris antioxidáns hatásának *in vitro* alátámasztására DCF fluoreszcencia módszerrel értékeltük annak hatását a celluláris ROS termelésre idős állatokból származó cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejteken (CMVEC). Azt találtuk, hogy az idős állatokból származó CMVEC-ben a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



26. ábra. Resveratrol csökkenti az oxidatív stresszt idős cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejtekben. **A:** reprezentatív ábrák, amelyek a DCF fluoreszcenciájának [reaktív szabadgyökök (ROS) termelését jelezve] áramlási citometriás analizisét mutatják fiatal (Young) és idős (Aged) F344xBN patkányokból származó primer cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejtek (CMVEC) resveratrol kezelése után. Az ábrán kontroll, festetlen sejtek is látható. **B:** A mérések összegezett eredményei (* $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged).

Resveratrol-kezelés csökkenti a NADPH-oxidáz 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 (27. ábra).



27. ábra. Resveratrol kezelés a NADPH-oxidáz expressziójának csökkenését eredményezi idős egerek agyában. Resveratrol kezelés (200 mg/kg po, 10 napig) hatása a NADPH-oxidáz *Nox1* (A), *Nox2* (B), *Nox4* (C) és *Ncf1* (*p47phox*; D) mRNS expressziójára fiatal (Young, 3 hónap) és idős (Aged, 24 hónap) egerek agykérgében (n = 6 csoportonként * $p < 0,05$ vs. Young; # $p < 0,05$ vs. Aged).

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

In vivo eredményeink alátámasztása céljából kimutattuk, hogy idős cerebro-mikrovaszkuláris 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 [197] 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 [195, 196]. Munkatársaimmal először

demonstráltuk, hogy a neurovaszkuláris kapcsolás öregedés okozta csökkenése helyreáll resveratrol kezelést követően. A kulcsfontosságú homeosztatisz 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, korábban dokumentált pozitív hatásához idős rágcsálókban [206, 207, 211].

Eredményeinknek fontos klinikai jelentősége van. Emberben a resveratrol jól tolerálható, jelentős toxicitásról nem számoltak be [212]. Bár a resveratrol biohasznosulása a parenchymás szövetekben viszonylag alacsony, a vérrel közvetlenül érintkező vaszkuláris endothélium ideális célpont a resveratrol és aktív metabolitjai számára [212]. Állatkísérletes eredményeink transzlációs értékét mutatja, hogy embereknél a rövid távú resveratrol kezelés dózisfüggően megnövelte az agyi véráramlást adott kognitív feladat végrehajtása közben [213]. Epidemiológiai felmérések szerint a resveratrolban gazdag mediterrán étrend jelentősen csökkenti az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás kockázatát [213], valamint a kakaóból származó szintén polifenol epikatechin [196] rendszeres fogyasztása javíthatja idősebb emberek kognitív funkcióit. 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 [214].

Egyre több kísérleti bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az endotheliális NO-termelés fontos szerepet játszik a neurovaszkuláris kapcsolásban [62, 68, 215]. Ezt támogatják megfigyeléseink, amelyek szerint az NO-szintézis gátlása drámaian csökkenti a neurovaszkuláris kapcsolást fiatal egerekben. Idős egerekben az NO-szintézis gátlása nem csökkentette a neuronális aktivitás által kiváltott alacsony CBF-válaszokat. Ez arra utal, hogy a cerebro-mikrovaszkuláris endotheliális diszfunkció központi szerepet játszik a neurovaszkuláris kapcsolás életkorral összefüggő diszregulációjában [197]. Fontos hangsúlyozni, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek dilatációs kapacitása az idős agyi érrendszerben nem károsodik, amint azt az adenzinra és a NO donor SNAP-re adott intakt válaszok mutatják [197]. 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. Számos bizonyíték támasztja alá ezt az elképzelést. Először, az öregedés során az agyi erekben (és az érrendszer egyéb területein is) megnövekszik a ROS termelése [197, 216]. Korábbi

tanulmányok arra utalnak, hogy ehhez a NADPH-oxidáz fokozott aktivitása/expressziója jelentősen hozzájárul [197]. Ezen eredményekkel összhangban munkatásaimmal kimutattuk, hogy a NADPH-oxidáz gátlása visszaállítja a neurovaszkuláris kapcsolást és az endothel-függő véráramlás növekedést idős egerekben. Másodsor, a NADPH-oxidáz expressziója szignifikánsan fokozott idős egerek agyában és cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejtjeiben. Harmadszor, az öreg egerek agyában megnövekedett 3-nitrotirozin-tartalmat mutattunk ki, amely a fokozott ONOO⁻-képződés biomarkere. Az endotheliális NO-ból O₂⁻ reaktív szabadgyök hatására történő ONOO⁻ képződés az NO biológiai hatásának csökkenésével jár [217, 218]. 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 endotélium-függő cerebro-mikrovaszkuláris dilatációt és a neurovaszkuláris kapcsolást idős egerekben. Ezen elképzelést támogatja, hogy a resveratrol kezelés hatékonyan csökkenti az életkorral összefüggő agyi oxidatív/nitrozatív stresszt, valamint csökkenti öreg cerebro-mikrovaszkuláris endothel sejtek ROS termelését. A resveratrol kezelés cerebro-mikrovaszkuláris antioxidatív mechanizmusában központi szerepet játszhat a NADPH-oxidáz expressziójának csökkenése az idős egéragyban, valamint idős egerek agyából izolált endothel sejtekben. Ezzel összefüggésben megemlítendő, hogy a resveratrol idős egerek aortájában is csökkenti a NADPH-oxidáz kifejeződését [199]. Érdekes módon a NOX4-tartalmú NADPH-oxidáz valószínűleg hozzájárul a mitokondriális oxidatív stressz életkorral összefüggő növekedéséhez [219]. Ebből a szempontból fontos, hogy a resveratrol hatékonyan csökkenti a mitokondriális oxidatív stresszt [220]. Ezekon felül a resveratrol közvetlenül is gátolja a NADPH-oxidáz aktiválását egy SIRT1-függő útvonalon keresztül [205]. Végül, a resveratrol aktiválja az érfalban található Nrf2 transzkripció faktorot, ami endogén antioxidáns rendszerek fokozott működéséhez vezet [201]. Ezek a mechanizmusok valószínűleg együttesen csökkentik a NADPH-oxidáz által termelt ROS szintjét.

Összefoglalva, 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 háttérében) központi szerepet játszhatnak az öregedés során kialakuló neurovaszkuláris szét-kapcsolásban.

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

Bevezetés

Amint azt már többször említettem, az agyi mikrokeringés patofiziológiás változásai kritikus szerepet játszanak az agyműködés életkorral összefüggő hanyatlásában [191]. Közülük nagy jelentőséggel bírnak a neurovaszkuláris egység életkorral összefüggő funkcionális eltérései, amelyek rontják az agyi véráramlás lokális szabályozó mechanizmusait [80]. Az ezt követő eltérések az agyi mikrokörnyezetben valószínűleg hozzájárulnak az idős betegek és idős laboratóriumi állatok cortikális funkcióinak romlásához [75-78, 197, 221, 222].

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy neuroendokrin mechanizmusok fontos szerepet játszanak az életkorral összefüggő vaszkuláris elváltozásokban [223, 224]. 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 [223]. A neurovaszkuláris egység sejtjei: a neuronok, vaszkuláris endotelsejtek és astrocyták [56, 183] jelentős mértékben expresszálnak IGF-1 receptorokat, és ismert célpontjai az IGF-1-nek [223]. Említettem, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat mechanizmusában a neuronális glutamát-által indukált endotheliális NO-nak [59, 62, 183], valamint astrocyta eredetű arachidonsav-származékoknak központi szerepe van. Ebből a szempontból fontos, hogy az IGF-1 hiány endothel diszfunkcióhoz és az NO biohasznosulásának csökkenéséhez vezet a perifériás keringésben [224], valamint az IGF-1 befolyásolja a celluláris arachidonsav metabolizmust is [225-228].

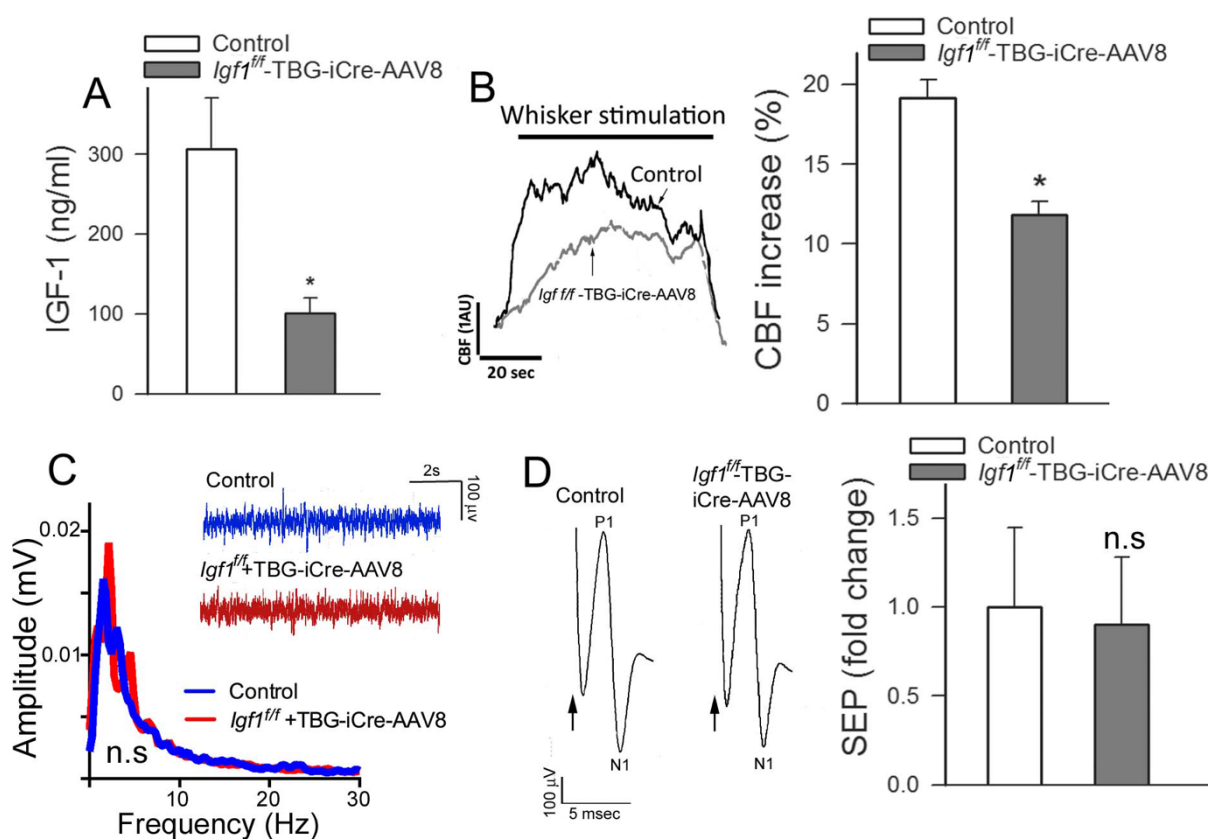
Az alább bemutatott vizsgálatokban azt a feltevést teszteltük, amely szerint az IGF-1 befolyásolja az NO és a vazodilatátor eikozanoid gliotranszmitterek szintézisét/felszabadulását az agyi mikrocirkulációban, valamint, hogy az alacsony szérumban IGF-1 szint a fenti mechanizmusok diszregulációján keresztül károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást. Hipotéziseink ellenőrzésére a felnőttkori, izolált endokrin IGF-1 hiány Cre-lox technológiával előállított új egérmodelljét használtuk. A hepatikus IGF-1 termelés adenovírus-asszociált csökkentését követően (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) [33] 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 vizsgálataival 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. Mindkét csoportban hasonló volt a szérumban IGF-1 szint a vírusok beadása előtt. A TBG-Cre-AAV8-at kapó egerek agyszöveti IGF-1 szintje is jelentősen alacsonyabb volt, mint a kontroll állatoké (28. ábra).

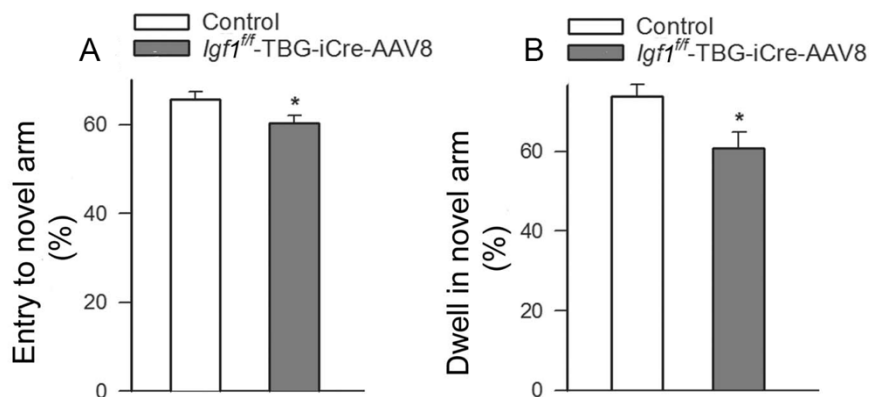
A bajusz stimuláció által a kontralaterális szomatoszenzoros kéregben indukált véráramlás (CBF) növekedés szignifikánsan csökkent IGF-1-hiányos egerekben. Az IGF-1 hiány csökkentheti a funkcionális hiperémiát azáltal, hogy károsítja a szenzoros stimuláció által kiváltott idegi aktivitást. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára spontán és kiváltott idegi aktivitást regisztráltunk kontroll és IGF-1 hiányos egerekben, és azt találtuk, hogy az elektrokoritikogram 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 (29. ábra).



28. ábra. Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolást. **A:** az *Igf1* adeno-asszociált kondicionális knock-out-ja (*Igf1^{ff}* + TBG-Cre-AAV8) szignifikánsan csökkenti a keringő IGF-1 szintjét a kontroll állatokhoz képest (*Igf1^{ff}* + 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 (ΔAUC az alapvonal %-ában; $n = 12$, $*p < 0,001$ vs. Control). **(C)** A kortikális 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 vizsgálatainkban 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 (29. ábra).

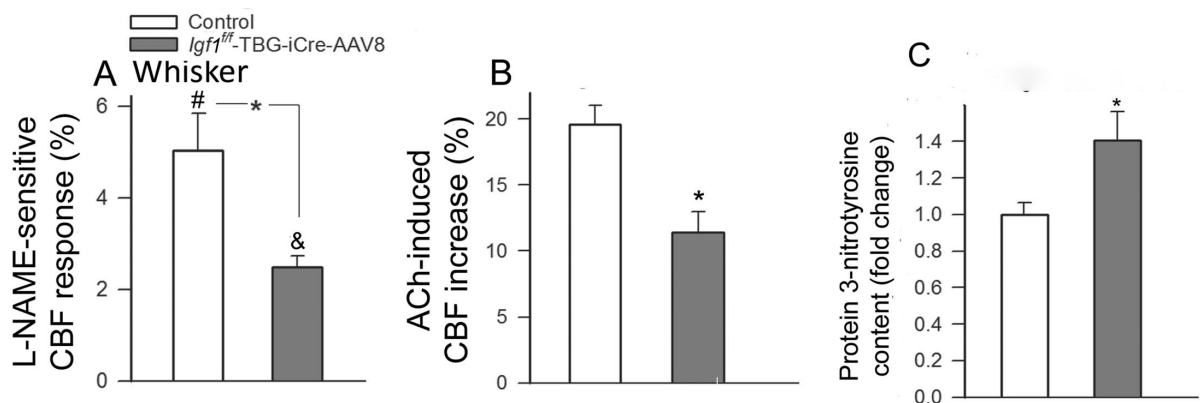


29. ábra. Az IGF-1 hiány a kognitív funkciók romlását okozza. A-B: Az IGF-1-hiányos állatok (*Igf1^{ff}* + TBG-Cre-AAV8) károsodott térbeli memóriát mutattak, amint azt a Y-maze új karjába (novel arm) történő belépések számának csökkenése ($*p = 0,001$ vs. Control), valamint a rövidebb explorációs idő is mutatja (dwell in novel arm: az új karban eltöltött idő a teljes explorációs idő %-ban, $p = 0,01$ vs. Control, $n = 20$ 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 kapcsolás NO-mediálta részét. Az endothel-függő dilatátor acetil-kolin (ACh) topikális kortikális alkalmazása a CBF szignifikáns növekedését eredményezte kontroll egerekben,

azonban az ACh-indukált CBF válaszok szignifikánsan csökkentek IGF-1-hiányos egerekben (30. ábra). Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy az IGF-1-hiány károsítja a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkciót. A perifériás keringés ereiben az IGF-1 csökkenti a vaszkuláris oxidatív stresszt és javítja az endothel funkciót [224]. Ennek megfelelően azt találtuk, hogy IGF-1 hiányos egerekben az agykéreg 3-nitrotirozin tartalma szignifikánsan megemelkedett (30. ábra), ami egyrészt az NO szintáz alegység *Nos3* csökkent expressziójával, valamint a NADPH-oxidáz *Nox1* és *Nox2* alegységek megnövekedett expressziójával járt együtt.

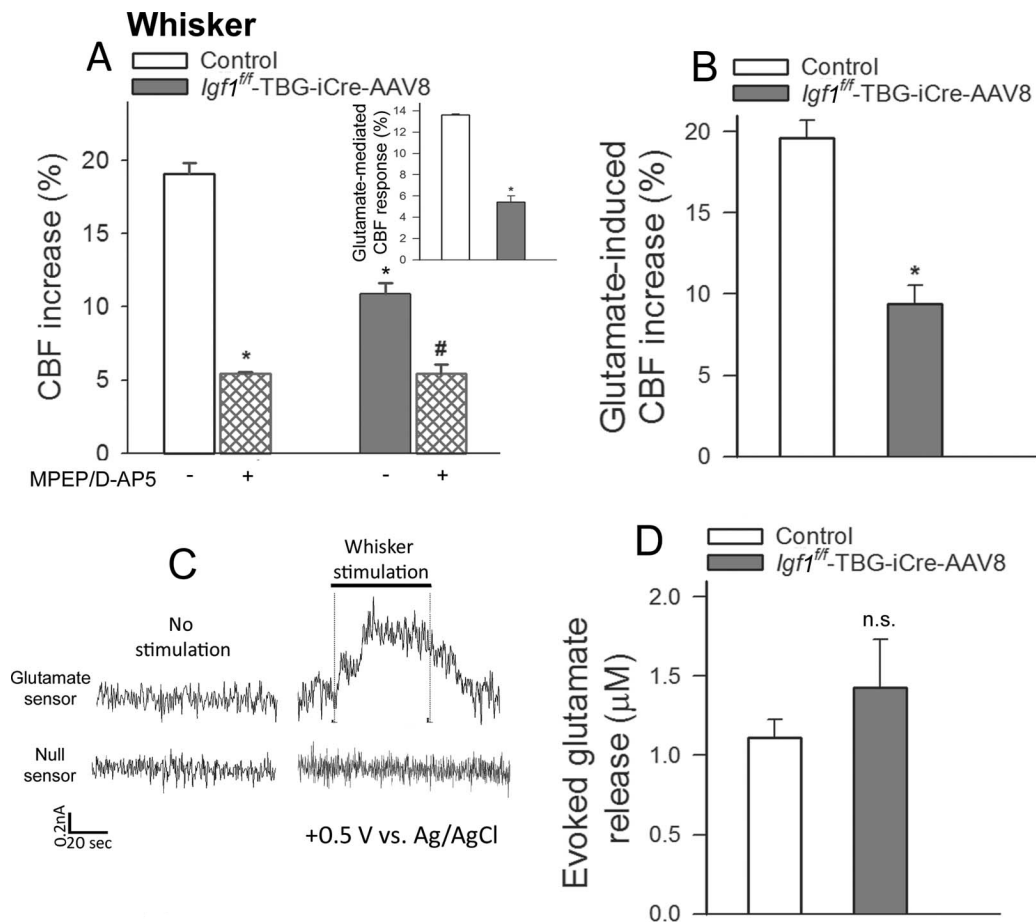


30. ábra. Az IGF-1 hiány által károsított cerebro-mikrovaszkuláris endothel diszfunkció szerepe a neurovaszkuláris szét-kapcsolásban. **(A)** A panel a szomatoszenzoros, lokális, kontralaterális bajusz-stimuláció által kiváltott agyi véráramlás (CBF) növekedés L-NAME-érzékeny, NO-közvetített részét (az L-NAME által okozott CBF csökkenés százalékos mértékéeként) mutatja kontroll és IGF-1-hiányos (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) egerekben ($n = 6$, $*p < 0,05$ vs. Control; $\#p < 0,05$ vs. Control L-NAME nélkül; $\&p < 0,05$ vs. *Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8 L-NAME nélkül). **(B)** Acetil-kolin topikális adása által kiváltott CBF válaszok kontroll és IGF-1-hiányos egerek szomatoszenzoros kérgében ($n = 6$, $*p < 0,05$ vs. Control). **(C)** Protein 3-nitrotirozin szint IGF-1-hiányos és kontroll egerek kérgi szövetében ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs. Control).

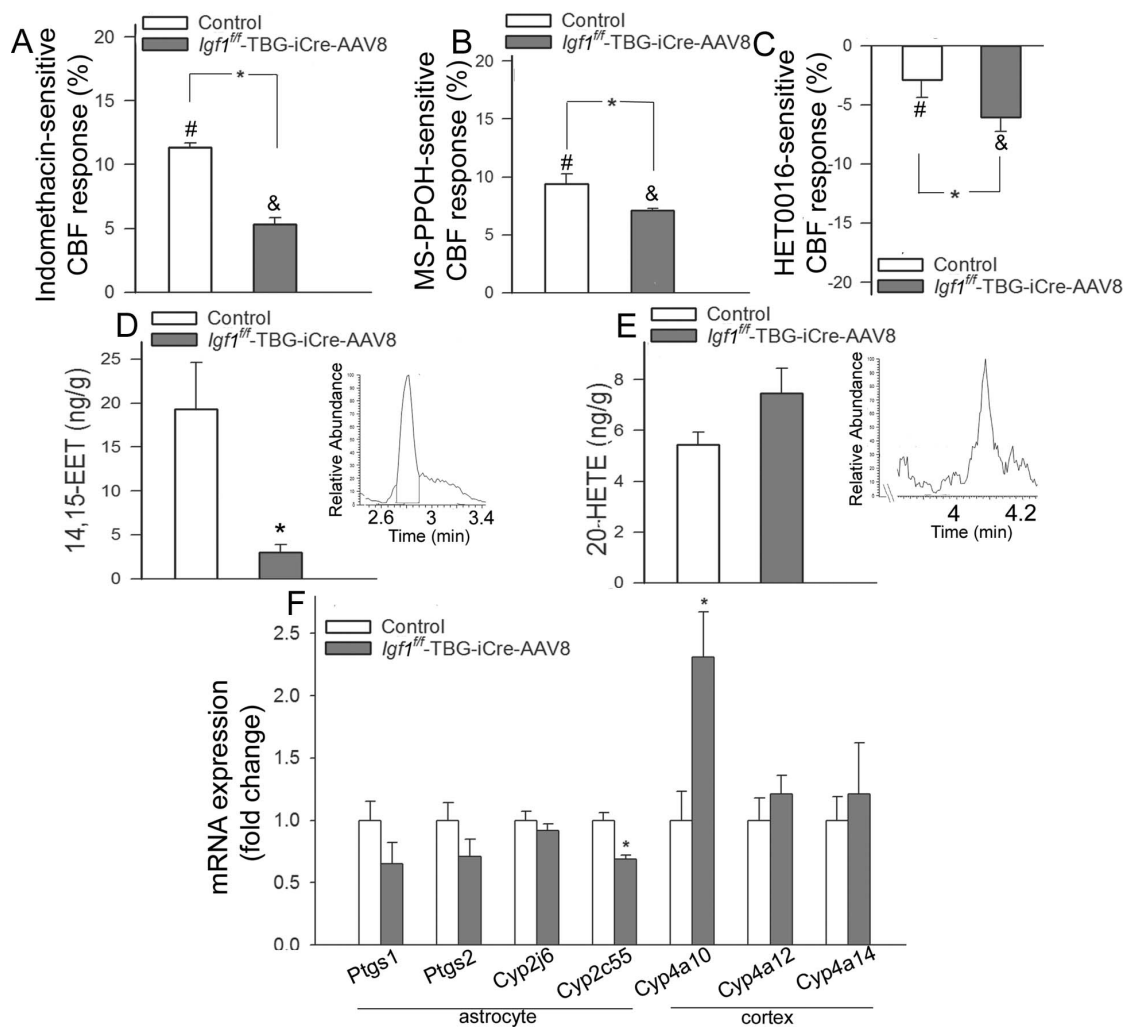
Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolat glutamát-indukálta mechanizmusait

A neuronális aktiváció során felszabaduló glutamát aktiválja az astrocyták metabotrop glutamát-receptorait (mGluR) valamint NMDA-receptorait, amik a neurovaszkuláris kapcsolatban központi szerepet játszó dilatátor gliotranszmitterek fokozott termeléséhez vezetnek [229]. Kontroll egerekben azt találtuk, hogy a metabotrop 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. Ez arra utal, hogy az IGF-1 hiány rontja a glutamát által közvetített neurovaszkuláris kapcsolást. Ezt a koncepciót alátámasztják, hogy az 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 (31. ábra). Ugyanakkor, az IGF-1 hiány diszregulálta a metabotróp glutamát-receptorok (*Grm2*, *Grm4*, *Grm5*) és az NMDA-receptorok (*Grin1* és *Grin2*) kifejeződését izolált astrocytákon.



31. ábra. Az IGF-1 hiány károsítja a neurovaszkuláris kapcsolás glutamát-indukálta mechanizmusait. (A) A metabotróp glutamát-receptorok (MPEP, 5×10^{-5} mol L⁻¹) és az NMDA-receptorok (N-metil-D-aszpartát, D-APV, 5×10^{-5} mol L⁻¹) antagonistáival végzett kezelés hatásai a szomatoszenzoros kéregben mért, kontralaterális bajusz-párna (whisker) stimuláció által kiváltott agyi véráramlás (CBF) válaszokra kontroll és IGF-1-hiányos egerekben (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8). Az „inlet” a neurovaszkuláris válasz glutamát által közvetített részét mutatja be (n = 6 csoportonként, **p* < 0,05 vs. Control; #*p* < 0,05 vs. *Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8). (B) L-glutamát (500 µmol/L) topikális adását követő CBF válaszok a szomatoszenzoros kéregben kontroll és IGF-1-hiányos egerekben (n = 6 csoportonként, **p* < 0,05 vs. Control). A C panel kísérletes regisztrátumokat demonstrál az extracelluláris glutamát változásainak méréséről bajusz-stimuláció hatására (5 Hz, 2 perc), amperometriával mérve, az egerek szomatoszenzoros kérgében elhelyezett glutamát bioszenzort használva (a részletekért lásd a Módszereket). A mérések összegzett adatai láthatók a D panelen, amelyek szerint nincs szignifikáns különbség (*p* = 0,4) a bajusz-stimulációval indukált cortikális glutamát jelek között kontroll (n = 5) és IGF-1-hiányos egerekben (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8, n=7).



32. ábra. Az IGF-1 hiány a neuronális aktiváció által kiváltott gliotranszmitterek diszregulációjához vezet, ami hozzájárul a neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz. **(A)** A kontralaterális bajusz-stimuláció által kiváltott, szomatoszenzoros kéregben mért agyi véráramlás (CBF) válasz indometacin-érzékeny, prosztaglandin-mediált része (az INDO jelenlétében a CBF százalékos csökkenése alapján számítva) kontroll és az IGF hiányos (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) egerekben (n = 6 csoportonként, **p* < 0,05 vs. Controll; #*p* < 0,05 vs. Controll, INDO nélkül; &*p* < 0,05 vs. *Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8 INDO nélkül). **(B)** A CBF-válasz MS-PPOH-érzékeny, EET-mediált része (az MS-PPOH jelenlétében a CBF százalékos csökkenése alapján számítva, n = 6 minden csoportban, * *p* < 0,05 vs. Controll; #*p* < 0,05 vs. Controll MS-PPOH nélkül); &*p* < 0,05 vs. *Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8 MS-PPOH nélkül). **(C)** A CBF válasz HET0016-érzékeny, 20-HETE-mediált része (a CBF százalékos csökkenése alapján számítva a citokróm P450 ω-hidroxiláz inhibitor HET0016 jelenlétében (n = 6 csoportonként, **p* < 0,05 vs. Controll; #*p* < 0,05 vs. Controll HET0016 nélkül; &*p* < 0,05 vs. *Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8 HET0016 nélkül). **(D–E):** 14,15 EET **(D)** és 20-HETE **(E)** termelése glutamáttal aktivált agyszelet preparátumokban kontroll és *Igf1^{fl/fl}*+TBG-Cre-AAV8 egerekből folyadékkromatográfia/tömegspektrometria-val mérve (n = 6 minden csoportban; **p* < 0,05 vs. Controll; részletekért ld. Módszerek fejezetet). **(F)** Ciklooxygenáz-1 és ciklooxygenáz-2 (*Ptgs1*, *Ptgs2*), EET-termelő epoxigenázok (*Cyp2j6*, *Cyp2c55*) valamint 20-HETE termelő ω-hidroxiláz *Cyp4a10*, *Cyp4a12*, *Cyp4a14* mRNS expressziója izolált astrocytákban valamint kontroll és IGF-1-hiányos egerek kérgi mintáiban (n = 5 minden csoportban, **p* < 0,05 vs. Control).

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

A neuronális glutamát hatására a neurovaszkuláris egység astrocytáiban az arachidonsavat a ciklooxygenázok vazodilatátor prosztaglandinokká, a P450 epoxigenázok pedig EET-ké alakítják [229]. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy kontroll állatokban a ciklooxygenáz inhibitor indometacin és az 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. Ez arra utal, hogy az IGF-1-hiány rontja a prosztaglandinok és EET-k által közvetített neurovaszkuláris kapcsolást. A dilatátor arachidonsav származékok mellett az IGF-1 hiány valószínűleg növeli a konstriktor hatású metabolitok termelődését neurális aktivációt követően. Erre utal, hogy 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 cortikális 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* expressziója csökkent, míg a 20-HETE-t termelő ω -hidroxiláz *Cyp4a10* expressziója nőtt IGF-1 hiányos egerekben (32. ábra).

Megbeszélés

A keringő IGF-1 koncentrációja az életkorral csökkenő GH-szint miatt jelentősen csökken mind idős emberekben, mind öreg laboratóriumi állatokban [223, 230]. Korábbi vizsgálatok szerint az IGF-1 szint korral járó csökkenése hozzájárul az érrendszer öregedéséhez, elősegíti az atherogenezist, valamint a szív- és érrendszeri betegségek és a stroke kialakulását [223, 224]. Munkatársaimmal elsőként mutattuk ki, hogy a szérumban IGF-1 hiány szignifikáns neurovaszkuláris diszregulációhoz vezet a neurovaszkuláris kapcsolat 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 [223]. Az értekezés későbbi részében bemutatott vizsgálatunk felveti, hogy ebben az IGF-1 hiánnyal asszociált neurovaszkuláris diszfunkció központi szerepet játszhat. Amellett, hogy jelentősen befolyásolja a neurovaszkuláris kapcsolat folyamatait, az IGF-1

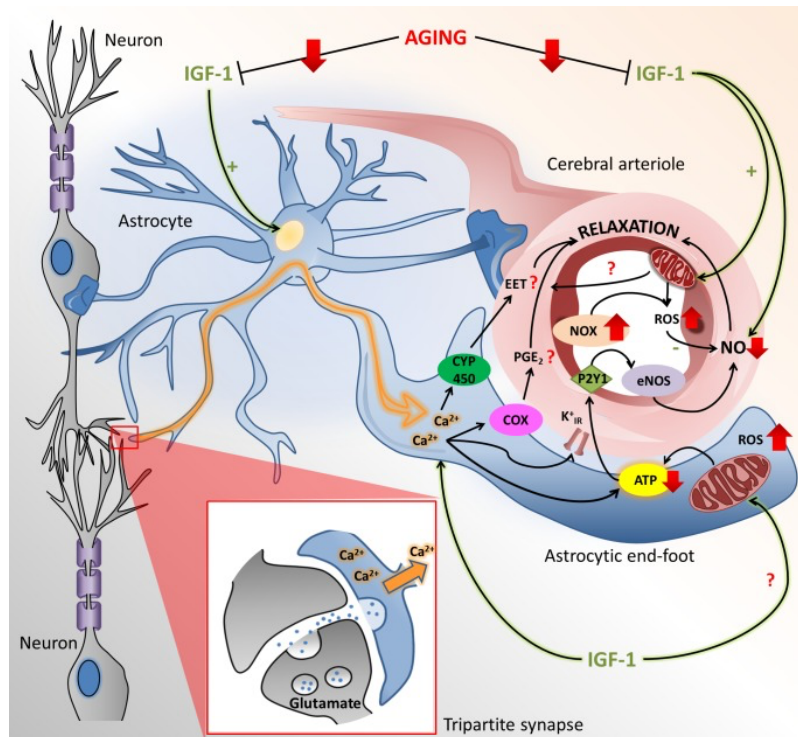
egyéb mechanizmusok révén is védheti az agy működését. Például, trofikus hatást gyakorol a glutamáterg szinapszisokra [231], megelőzheti a vér-agy gát károsodását és neuroinflammációt csökkentő hatása van [33].

A mikrovaszkuláris endothelsejtek közvetlenül ki vannak téve a keringő IGF-1 hatásának, valamint fokozottan expresszálnak IGF-1 receptorokat [224]. Amint azt korábban, (más laboratóriumokkal együtt) bemutattuk, a cerebro-mikrovaszkuláris endothelsejtek NO-termelése fontos szerepet játszik a funkcionális hiperémiában [62, 68, 215]. Úgy tűnik, hogy IGF-1 hiányos egerekben a neurovaszkuláris csatolás L-NAME-érzékeny, NO által közvetített része is csökkent. Ez arra utal, hogy az endothel diszfunkció is hozzájárul a neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz IGF-1 hiány esetén [197], hasonlóan az öreg fenotípus eltéréseihez [197, 222]. Feltehetőleg az IGF-1 hiány a fokozott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz által (csökkentett NO felszabadulást okozva) vezet endothelialis diszfunkcióhoz és károsodott vazodilatációhoz. Ezt az elképzelést számos bizonyíték támasztja alá. Először, az IGF-1-hiányos egerek (hasonlóan az idős egerekhez [197, 222]) fokozott agyi és cerebrovaszkuláris ROS-termelést mutatnak [229]. Másodsor, primér endothelsejtek IGF-1-gyel történő kezelése csökkenti a celluláris ROS képződést [232]. Harmadszor, miként az öregedés esetén említettem, az endothelialis NO reakcióba lép a megnövekedett $O_2^{\cdot-}$ -el ONOO-t képezve, ezáltal csökkentve az NO biológiai hasznosulását [217, 218]. Ennek megfelelően az IGF-1-hiányos egerek agyában megnövekedett a 3-nitrotirozin szintje, amely a fokozott ONOO-képződés biomarkere. Az értágító hatása mellett az NO sokrétű endothel védő hatást is biztosít, beleértve a pro-angiogén, anti-apoptotikus és gyulladásgátló hatásokat [223, 224]. Így valószínű, hogy az IGF-1 hiányával összefüggő károsodott endothel funkció összetett fenotípusos következményekkel jár az agyi mikrocirkulációban (pl. mikrovaszkuláris denzitás változásai [223, 224]), amelyeket jövőbeni vizsgálatoknak kell tisztázni.

A neurovaszkuláris kapcsolatban a neuronális glutamát-által indukált, astrocyta eredetű arachidonsav metabolitok (EET-k, prosztaglandinok) is fontos szerepet játszanak [229]. Elsőként mutattuk ki munkatársaimmal, hogy az IGF-1 hiány megváltoztatja az astrocyták fenotípusát, károsítva a neurovaszkuláris kapcsolat astrocyták által közvetített részét. Demonstráltuk, 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.

Összefoglalva, eredményeink szerint a szérumban IGF-1-hiány funkcionális és fenotípusos változásokat okoz a cerebrovaszkuláris endothel sejtekben és astrocytáknál, ami által neurovaszkuláris szét-kapcsoláshoz, és kognitív károsodáshoz vezet.



33. ábra. Az öregedés során kialakuló IGF-1 hiány hatásai a neurovaszkuláris kapcsolás folyamataira. Az ábrán a neuro-glio-endotheliális kapcsolási mechanizmusok IGF-1 hiánnyal összefüggő változásainak sematikus illusztrációja látható. Az astrocyták közvetítő szerepet játszanak a neuronok és a vaszkuláris sejtek közötti kölcsönhatásban azáltal, hogy kapcsolatot képeznek a neuronális szinapszissal, valamint a cerebrovaszkuláris endothellel és simaizommal. Az aktív szinapszissal felszabaduló glutamát kalcium felszabadulást vált ki az astrocytáknál, ami az erek körbevevő talpában aktiválja a CYP450 és a ciklooxygenáz (COX) által előállított értágító eikozanoidok (epoxieikosatriénsavak (EET)) és prosztaglandinok termelését. A keringő IGF-1 szintjének életkorral összefüggő csökkenése az öregedéssel járó egyik legfontosabb endokrin változás. Az öregedés IGF-1-hiányos egérmódeljeiben szerzett bizonyítékok alapján az IGF-1 életkorral összefüggő csökkenése rontja a funkcionális hiperémia astrocyták és endothélium által közvetített mechanizmusait. (Aging-öregedés, IGF-1: inzulinszerű növekedési faktor-1, CYP450: cytochróm P450, eNOS: endotheliális NO szintáz, NOX: NADPH oxidáz alegység, ROS: reaktív szabad gyökök, P2Y1: purinerg ATP receptor, NO: nitrogén-monoxid.) *Toth P et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 312(1): H1–H20. 2017*

IV.4. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idős emberekben: 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 (VCID) patogeneziséhez [233]. Azok a mechanizmusok, amelyek révén az öregedés rontja a neurovaszkuláris kapcsolást magukban foglalják a nitrogén-monoxid (NO) endotheliális termelésének csökkenését [59, 62, 183] és a neurovaszkuláris egység astrocytáinak diszfunkcióját [233]. Mindehhez hozzájárulnak az öregedéssel összefüggő fokozott celluláris oxidatív stressz és mitokondriális diszfunkció [197, 233-236]. Ezekben a mechanizmusokban az életkorral csökkenő keringő IGF-1-nek központi szerepe lehet [223, 230, 237-240]. 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 [224, 241]. 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 [242, 243]. Mindezek ellenére az életkorral kialakuló IGF-1 hiány neurovaszkuláris hatásait emberben nem vizsgálták.

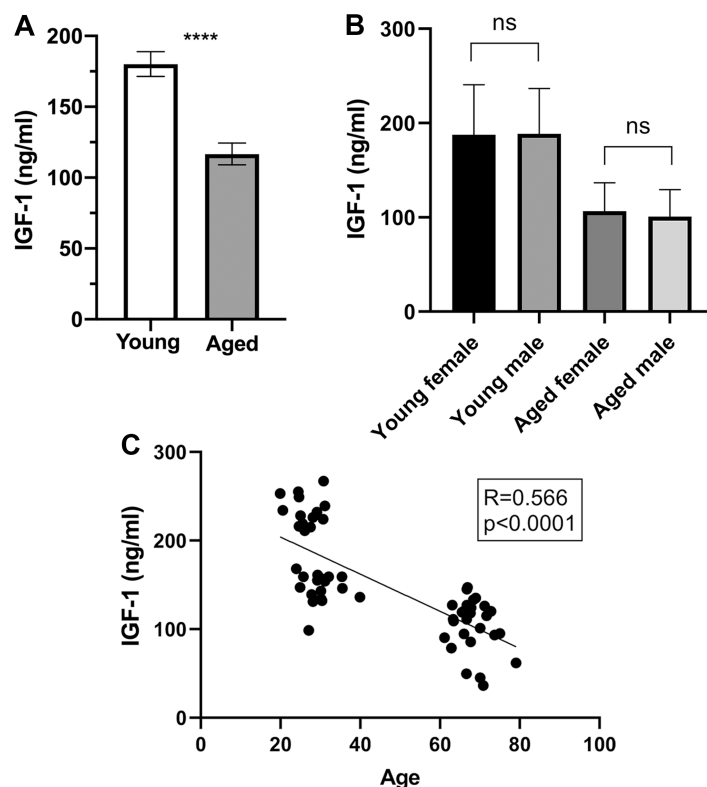
Az itt bemutatott vizsgálatok feltevése az volt, hogy a szérum IGF-1 szintjének csökkenése idős emberekben korrelál az NVC válaszok életkorral összefüggő csökkenésével. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez egy keresztmetszeti felmérésben vizsgáltunk egészséges fiatal (18-40 éves) és idős (≥ 60 éves)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

Eredmények

A szérum IGF-1 szint szignifikánsan csökkent idősokban, és korrelál az életkorral

A szérum 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 szérum IGF-1 szintje szignifikánsan korrelált az életkorral (34. ábra). A vizsgálatban résztvevők alapvető kardio-cerebrovaszkuláris rizikófaktorait vizsgálva azt találtuk, hogy az átlagos artériás vérnyomás szignifikánsan magasabb volt az idősebb

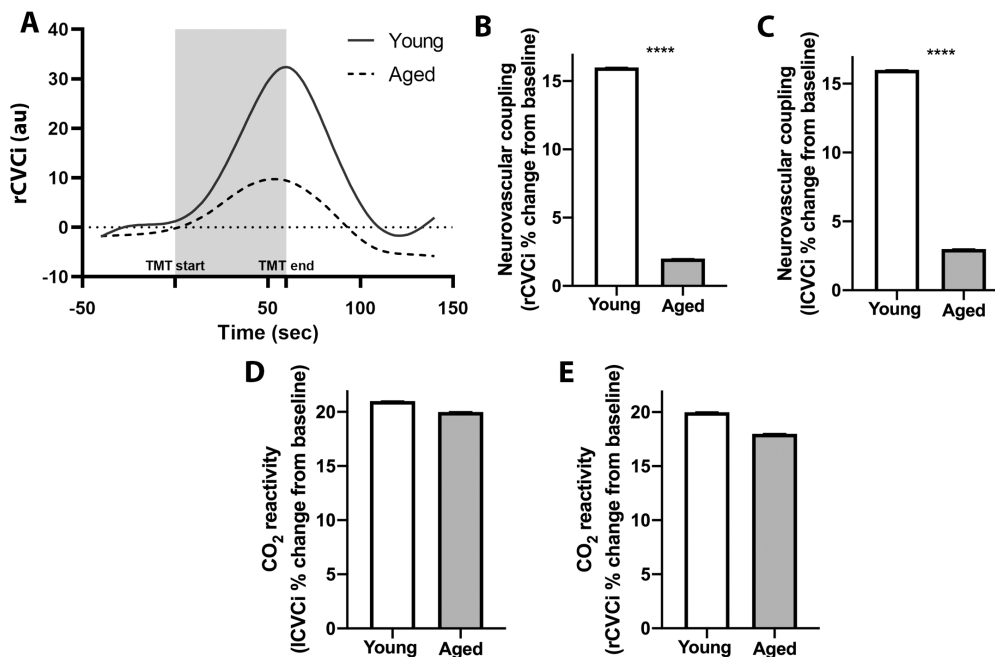
résztevőknél, mint a fiatal önkénteseknél, ugyanakkor a hipertónia betegség nem volt gyakoribb az idős résztvevők között. A fiatalok körében szignifikánsan gyakoribb volt a dohányzás.



34. ábra. A keringő IGF-1 szint szignifikánsan csökkent az idősebb vizsgálati résztvevőkben. A: A szérumban IGF-1 szintje (ng/ml) szignifikánsan csökkent az 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 (35. ábra).



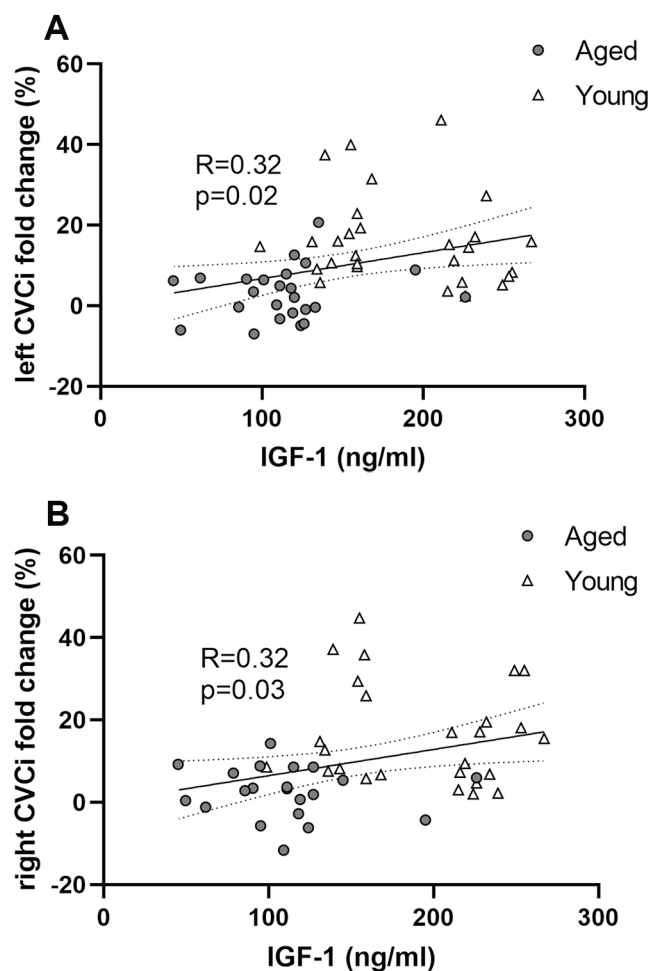
35. ábra. A neurovaszkuláris kapcsolás (NVC) csökkent idős emberekben. A: A jobb agyi vaszkuláris konduktancia index (CVCi) változásainak regisztrátuma a „trail making” kognitív teszt végzése közben egy 25 éves (young) és egy 65 éves (aged) vizsgálati résztvevő arteria cerebri media-jában (MCA) mért áramlási értékekből származtatva. A szürke terület azt az időszakot jelzi, amíg a TMT tesztet végezték a vizsgálati alanyok. A B–C oszlopdiagramok a fiatal (n = 31) és idős (n = 32) személyek NVC-válaszainak összefoglaló adatait mutatják, a jobb (rCVCi, B) és bal (ICVCi, C) MCA-ban mért áramlási értékek százalékos változásaiként kifejezve (**** $p < 0,0001$ vs. Young; *** $p < 0,003$ vs. Young). D–E: CO₂ reaktivitás a vizsgált fiatal és idős csoportokban, a CVCi százalékos változásában kifejezve a bal (D) és a jobb (E) MCA-ban a légzésvisszatartási teszt során.

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

3T MRI-vel mérve 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 szérum 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 szérum IGF-1 szint szignifikánsan korrelált a CVCi változásaival mindkét MCA-ban a „trail making” teszt alatt a vizsgálatban résztvevőknél. Ez azt jelzi, hogy a szérum IGF-1 szint korfüggően korrelál az NVC válaszokkal (36. ábra).



36. ábra. Az életkorral csökkenő IGF-1 szint korrelál a neurovaszkuláris kapcsolás károsodásával. A–B: A szérumban IGF-1 szintje és a neurovaszkuláris válaszok közötti korreláció az agyi vaszkuláris konduktancia index [CVCi] százalékos változásában kifejezve a trail making teszt végzése közben, transzcraniális Doppler-szonográfiával mérve a bal (B) és a jobb (C) 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 emberekben kimutattuk, hogy a neurovaszkuláris kapcsolás csökkent fiatal felnőttekhez képest. TCD-alapú neurovaszkuláris kapcsolást vizsgáló tanulmányunk kiegészíti korábbi vizsgálatok eredményeit, amelyek az NVC válaszok életkorral összefüggő károsodását mutatták ki fMRI-vel, fNIRS-sel és dinamikus retina keringés vizsgálattal [244-247]. Nagyon fontos ismételt kiemelni, hogy az NVC válaszok életkorral összefüggő károsodása univerzális jelenség, amely laboratóriumi állatokban és emberben is megtalálható [233, 245, 248]. 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 [249, 250], illetve az agyi kapilláris hálózat kor-függő ritkulása állhat [251-253].

Az itt bemutatott eredmények voltak az elsők, amelyek transzlációs bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozóan, hogy a keringő IGF-1 szintjének életkorral összefüggő

csökkenése hozzájárulhat az NVC-válaszok károsodásához idős emberekben, kiterjesztve a már bemutatott preklinikai eredményeket [224, 241-243]. 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 [241, 243] feltehetőleg fokozott oxidatív stressz okozásán keresztül [241, 243]. Emellett az IGF-1-hiány a neurovaszkuláris egység astrocytáiban [242] megváltoztatja az NVC-t mediáló arachidonsav származékok termelését, azok egyensúlyát a konstriktor mediátorok felé eltolva. Az NVC astrocyta eredetű faktorainak modulálásához az IGF-1-nek át kell jutnia a vér-agy gáton (BBB). Feltételezték, hogy az IGF-1 egy telíthető transzportrendszeren keresztül jut át a BBB-n [254]. Ennek a rendszernek az életkorral összefüggő változásait és a lokális IGF-1 hiányban betöltött szerepét a jövőben tanulmányozni kell.

Összefoglalva, preklinikai eredményeinkből kiindulva kimutattuk, hogy idős egészséges emberekben a neurovaszkuláris kapcsolás csökkent, ami szignifikánsan korrelál az életkorral csökkenő szérum 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 [195, 255-257], 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 egérmodellekben úgy tűnik, hogy több, életkorral összefüggő mechanizmus szinergikusan rontja az NVC-válaszokat, ideértve a mitokondriális oxidatív stresszt [236], a NAD⁺ hiányt és a károsodott SIRT1 jelátvitelt [234, 258]. 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 termelődés 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 idézzon 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 astrocytákban indukált csökkent dilatátor és fokozott konstriktor gliotranszmitter termelésnek.

- Preklinikai eredményeinkből kiindulva kimutattuk, hogy idős egészséges embereknél a neurovaszkuláris kapcsolat csökkent, ami szignifikánsan korrelál az életkorral csökkenő szérumban IGF-1 szinttel.

VI. Módszerek

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

Állatok

Kísérleteinkhez fiatal (3 hónap, n=80) és idős (24 hónap, n=80) hím C57/BL6 egereket a National Institute on Aging-tól vásároltunk. A pericyták megjelenítéséhez fiatal (3 hónapos) és idős (24 hónapos) α -SMA-GFP transzgenikus egereket használtunk (Acta2 promotert használva a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) expressziójának irányítására [259]). A homozigóta simaizom α -aktin (SMA)-GFP egerek Dr. James Tomasek (Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK) nagylelkű ajándéka voltak. 3-5 hím állat volt elhelyezve egy ketrecben takarmány és víz ad libitum elérésével. Az egerek specifikus patogén-mentes barrier mögött voltak, a vizsgálatok előtt a kísérleti protokollokat az Institutional Animal Use and Care Committee of the University of Oklahoma Health Sciences Center hagyta jóvá.

Angiotensin II i.v infúziós pumpa implantáció

Magas vérnyomás kiváltására Alzet mini-ozmotikus pumpákat (0,15 μ l/h, 42 nap; Durect Co, Cupertino, CA) ültettünk be fiatal és idős egerek háti subcutan szövetei közé ketamin/xylazin altatás mellett. A pumpákat sóoldattal vagy Ang II oldattal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) töltöttük meg, amelyek (subcutan) 1000 ng/perc/kg Ang II-t adtak le 28 napon keresztül [260].

Vérnyomás mérés

Minden kísérleti csoportban az egerek szisztolés vérnyomását farokmandzsetta módszerrel (CODA Non-Invasive Blood Pressure System, Kent Scientific Co., Torrington, CT) mértük a minipumpa beültetés előtt, majd azt követően 2 és 4 héttel (a terminális kísérletek végzése előtt).

Viselkedési vizsgálatok

Az angiotensin pumpák beültetését követő 4. hét végén az egerek tanulási képességét az „elevated plus maze” alapú tanulási protokoll alkalmazásával értékeltük Carrie és munkatársai módszerei szerint [261]. Röviden, egy szürke 40-cm-re megemelt labirintust (elevated maze) használtunk, aminek két nyitott karja (25x5 cm) és két (25x5 cm) zárt karja

derékszögben egy központi platformhoz (5x5 cm) rögzül. Az egereket egyenként helyeztük el az egyik nyitott kar végére, hátukkal a központi platformnak. Az 1. és 2. napon megmértük azt az időt, ami alatt az egerek áthaladtak az egyik zárt kar közepét jelző vonalon (transzfer latencia). Az egerek testének és mindegyik mancsának a vonal másik oldalán kellett lennie. Ha egy egér 120 másodperc elteltével nem lépte át a vonalat, akkor annak túl oldalára helyeztük. A vonal átlépése után az egereknek 30 másodperc állt rendelkezésükre a berendezés további felfedezésére. A tanulási folyamatot a transzfer latencia 2. napon mért csökkenése jelzi. Kvantitatív elemzéshez a tanulási indexet használtuk, ami az 1. és 2. napon mért transzfer latencia relatív különbsége. A magasabb tanulási index jobb hippocampális funkciót jelez.

Az agyi véráramlás autoregulációjának mérése

Az angiotensin pumpák beültetése utáni 28. napon az állatokat α -kloralózzal (50 mg/kg, i.p.) és uretánnal (750 mg/kg, i.p.) altattuk el, endotracheálisan intubáltuk és lélegeztettük (MousVent G500; Kent Scientific Co, Torrington, CT). A rektális hőmérsékletet 37 °C-on tartottuk fűtőpárna (Kent Scientific Co, Torrington, CT) segítségével. A kilégzés végi CO₂ 3,2% és 3,7% között volt tartva. A jobb femorális artériába kanült helyeztünk az artériás vérnyomás mérésére (Living Systems Instrumentations, Burlington, VE). Az egereket sztereotaxiás keretre helyeztük, majd a fejbőrt és a csonthártyát hosszában felvagtuk és eltartottuk. A corticális véráramlást laser speckle áramlásmérővel (PeriCam PSI System, Perimed, Stockholm, Svédország) mértük a bregma és a lambda között. Az artériás középnyomás (MAP) és a vérgázok stabilizálódása után a MAP-ot 20 Hgmm-es lépésekben emeltük vagy csökkentettük fenilefrin intravénás infúziójával (1-2 μ g/kg/perc), illetve ellenőrzött vérlebocsátással (100-400 μ l artériás vér) (Niwa és munkatársai protokollját alkalmazva [262]). A MAP vizsgált tartománya 40-160 Hgmm volt. A CBF értékeket 5 perccel a MAP megváltoztatása után rögzítettük. Az agyi véráramlás (CBF) változásait a 80 Hgmm-es szisztolés nyomásnak megfelelő CBF-hez viszonyítva fejeztük ki [263].

Izolált artéria cerebri media (MCA) distális szegmentumok nyomás-indukálta válaszainak vizsgálata

Az *in vivo* autoregulációs mérések után az egereket decapitáltuk, az agyat a koponyacsontból eltávolítottuk, és a további funkcionális vizsgálatokhoz mikrosebészeti eszközökkel izoláltuk a középső agyi artériák (MCA) distális (emberben M3-nak megfelelő) szegmenseit, korábban közölt protokolljainknak megfelelően [264, 265]. Röviden, az MCA szegmenseket két üveg mikropipettára csomóztuk egy szerv-kamrában, és a pipettákon

keresztül 60 Hgmm-es intraluminális nyomást hoztunk létre (a mikropipetták hidrodinamikai ellenállása azonos volt). A be- és kiáramlási nyomásokat egy nyomás-szabályozó rendszerrel (Living Systems Instrumentation, Burlington, VE) kontrolláltuk, illetve mértük. A belső vaszkuláris átmérőt egyedileg épített videomikroszkóp rendszerrel mértük, és folyamatosan rögzítettük számítógépes adatgyűjtő rendszerrel. Minden eret 60 percig 60 Hgmm-es intraluminális nyomáson inkubáltunk oxigénizált (21% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) Krebs-pufferben (37 °C-on). Az MCA-k autoregulációs funkciójának tesztelésére a vaszkuláris myogén válasz statikus és dinamikus komponenseit egyaránt értékeltük, az értekezésben a statikus válaszok kerülnek bemutatásra. A vaszkuláris myogén válasz statikus komponensét az intraluminális nyomás (0 és 180 Hgmm közötti) lépésenkénti (egyenként 5 perces 10 Hgmm-es lépések) növekedésére adott érátmérő válaszok mérésével határoztuk meg.

A 20-hidroxi-5,8,11,14-eikozatetraén sav (20-HETE) az arachidonsav vazokonstriktor metabolitja, amelyet a citokróm P450 ω -hidroxilázok termelnek [16, 45, 266, 267]. A 20-HETE myogén válaszban betöltött szerepének tisztázására az MCA-kat a citokróm P450 ω -hidroxiláz inhibitor HET0016 (10⁻⁶ mol/l, 30 percig, a Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) jelenlétében inkubáltuk, majd megismételtük a myogén válaszok kiváltását [268]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a tranziens receptor potenciál kanonikus típusú (TRPC6) csatornák részt vesznek a myogén válasz szabályozásában [15]. A TRPC csatornák szerepének felmérése érdekében a myogén érválaszokat megismételtük SKF96365 (5x10⁻⁶ mol/l, 15 percig), specifikus TRPC csatorna blokkoló jelenlétében. Minden kísérlet végén a passzív átmérőgörbék (0-180 Hgmm) vettük fel Ca²⁺-mentes, nifedipint (10⁻⁵ mol/L) tartalmazó Krebs-puffer jelenlétében. Az érválaszok az erek adott nyomásértéken mért passzív átmérő értékeire vannak normalizálva.

Western blott

Immunoblot vizsgálatokat végeztünk a TRPC6 fehérje expresszió kimutatására MCA-homogenizátumból, illetve vér-agy gát tight-junction fehérje (ZO-1, occludin és claudin-5) kimutatására hippocampális homogenizátumokban. Az egyes állatokból származó MCA-kat és hippocampális mintákat (n=6 egér csoportonként) homogenizáltuk proteázgátlókat tartalmazó lízispufferben. A mintákat ezután SDS-Page gélelektroforézisnek vetettük alá, majd PVDF membránra vittük át. A membránokat 5% BSA-val blokkoltuk (2% Tweenben PBS-ben, 2 órán át, szobahőmérsékleten), inkubáltuk elsődleges antitesttel TRPC6 ellen (egér monoklonális antitest, 1:1000, egy éjszakán át 4 °C-on, Abcam), ZO-1 ellen (R40.76 klón, patkány monoklonális, 1:500, egy éjszakán át 4 °C-on, Millipore), occludin ellen (nyúl poliklonális,

1:1000; egy éjszakán át 4 °C-on, Abcam) illetve claudin-5 ellen (nyúl poliklonális, 1:1000, egy éjszakán át 4 °C, Abcam). Ezt követően a megfelelő HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltunk 2 órán át, szobahőmérsékleten. A membránokat Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) segítségével hívtuk elő. A vizsgált fehérjék relatív mennyiségét denzitometriával határoztuk meg, kontrollként β -aktin-t használva (egér monoklonális, 1:15000, 45 perc, szobahőmérsékleten, Abcam).

Kvantitatív real-time RT-PCR

Kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk Strategen MX3000 platformon a következő gének mRNS-expressziójának elemzésére az egyes kísérleti csoportok egereinek MCA-jában: 20 HETE-termelő enzimek: *Cyp4a12*, *Cyp4a10*, *Cyp4a14* valamint *Trpc6* [269]. A totál RNS-t Mini RNA Isolation Kit-tel (Zymo Research, Orange, CA) izoláltuk, majd reverz transzkripciót végeztünk Superscript III RT-vel (Invitrogen) [269]. Az amplifikációs hatékonyságot standard érminta hígítási sorozatával határoztuk meg. A kvantifikálást a határfok-korrigált $\Delta\Delta Cq$ módszerrel végeztük. Meghatároztuk a *Hprt*, *Ywhaz*, *B2m* és *Actb* referencia gének relatív mennyiségét, és egy normalizációs faktort számítottunk a belső normalizálás geometriai átlaga alapján. A PCR-reakció pontosságát olvadáspont-analízissel és a termék 2%-os agaróz gélen való megjelenítésével határoztuk meg.

A vér-agy gát integritásának meghatározása

A) *Nátrium-fluoreszcein tracer esszé*: Az angiotensint tartalmazó pumpák beültetését követő 28. napon egy külön állatcsoportban vizsgáltuk a vér-agy gát (BBB) integritását. A BBB permeabilitásának számszerűsítésére nátrium-fluoreszcein tracer esszét használtunk Kaya és munkatársai [270] protokollja szerint. Röviden, az egereket ketamin/xilazin (100/15 mg/kg, i.m.) oldattal altattuk el, majd kis molekula méretű vízdékony nátrium-fluoreszceint (5 ml/kg, 2% fiziológiás sóoldatban, Sigma Aldrich, St Louis, MO) adtunk be az állatoknak intravénásan, retroorbitálisan. 30 perccel a tracer beadása után az állatokat transzcardiálisan perfundáltuk 1x heparint tartalmazó PBS-sel. Ezután az egereket decapitáltuk, az agyukat eltávolítottuk. Izoláltuk a hippocampust, centrális fehérállományt és a prefrontális kérget mindkét oldalról, az izolált agyszövetek nedves súlyát megmértük. A mintákat 500 μ l jéghideg PBS-ben homogenizáltuk, majd 500 μ l 60%-os triklór-ecetsavat adtunk hozzájuk a fehérjék kicsapásához. 30 perces inkubálás után (4 °C-on) a mintákat 18 000 g-vel (4°C-on, 10 percig) centrifugáltuk. A felülúszókból az extravazált nátrium-fluoreszceint spektrofotó-

fluorometriával (440 nm gerjesztési hullámhosszon és 525 nm emissziós hullámhosszon) microplate-leolvasóval (Tecan Group Ltd, Mannedorf, Svájc) határoztuk meg, és szövettömegre normalizáltuk [271].

B) *IgG extravazáció kimutatása immunofluoreszcenciával.* A fokozott hippocampalis cerebrovaszkuláris permeabilitás további markereként a BBB-n keresztül történő IgG extravazációt immunofluoreszcens jelöléssel és konfokális mikroszkóppal mutattuk ki.

Immunofluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia

Az egereket transzcardiálisan perfundáltuk PBS-sel, decapitáltuk, majd az agyakat eltávolítottuk és félbevágtuk. A bal féltekéket egy éjszakán át fixáltuk 4%-os paraformaldehidben, majd szacharóz oldatokban történő inkubációt követően (10%, 20% és 30% egy éjszakán át) Cryo-Gelben lefagyasztottuk (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). 70 µm-es koronális metszeteket vágunk a hippocampus vetületében, majd azokat krioprezerváló oldatban tároltuk (25% glicerin, 25% etilénlikol, 25% 0,2 M foszfát puffer, 25% desztillált víz) -20 °C-on. A kiválasztott metszetek 1,6 mm-re caudálisan voltak a Bregmához képest (rostralis hippocampus). Mosás után (3x5 perc TBS-sel plusz 3x5 perc 1x TBS+0,25% TritonX-100-zal) a metszeteket 1%-os nátrium-bórhidrid oldattal kezeltük 5 percig. Egy második mosási lépés (3x5 perc desztillált vízzel plusz 3x5 perc 1x TBS-sel) és 5% BSA/TBS-ben (0,5% Triton X-100-zal, 0,3 M glicinnel és 1% halzselatinnal) 3 órán át történő blokkolás után a metszeteket primer antitestekkel 2 éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk (immunostaining). A következő elsődleges antitesteket használtuk: endothel sejtek jelölésére egér anti-CD31 (1:100, fikoeritrin (PE) konjugált; Cat N: 553373, BD Pharmingen, San Jose CA) vagy egér anti-CD31 (1:50, konjugálatlan) ; Cat N: 550274, BD Pharmingen, San Jose CA); egér anti-IgG (1:100, FITC konjugált; Cat N: 005-090-003, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) a extravazált IgG jelöléséhez; egér anti-Iba1 (1:50, nem konjugált; Cat N: 019-19741, Wako, Richmond, VA) microglia, és egér anti-CD68 (1:100, nem konjugált; Cat N: ab125212, Abcam, Cambridge MA) aktivált microglia jelölésére. A következő másodlagos antitesteket használtuk: kecske anti-nyúl IgG, Alexa Fluor 647 (1:1000, Cat N: 4414, Cell Signaling, Danvers, MA) és kecske anti-patkány IgG, Alexa Fluor 568 (1:1000, Cat N: A11077, Molecular Probes, Grand Island, NY). A metszeteket 3x5 percig TBS-sel majd 3x5 percig 1x TBS+0,25% TritonX-100-zal mostuk. A magok festéséhez Hoechst 33342-t használtunk. Ezután a metszeteket tárgylemezekre helyeztük és fedőlemezzel fedtük. A konfokális képeket Leica SP2 MP konfokális laser pásztázó mikroszkóppal készítettük.

Cerebro-mikrovaszkuláris kapillárisok pericyta borításának vizsgálata

A pericyták kulcsszerepet játszanak a BBB fenntartásában és az agyi mikrocirkuláció szerkezeti integritásának megőrzésében [98]. A mikroerek pericyta borítottságának életkor és magas vérnyomás által kiváltott változásainak felmérésére fiatal és idős α SMA-GFP transzgenikus egerek agymetszeteiben angiotenzin II-vel indukált magas vérnyomással vagy anélkül immunjelölést végeztünk a CD31 endothel markerrel. A pericyta lefedettség vizsgálatára az α SMA-GFP pozitívítást 10 μ m-nél kisebb átmérőjű mikroereken vizsgáltuk. A pericyták számát (α SMA-GFP-pozitív perivaszkuláris sejtekként azonosítva, tipikus pericyta morfológiával, hosszú nyúlványokkal, amelyek beborítják a kapillárisokat, Hoechst 33342-vel festett, prominens, kerek sejtmaggal) a látóterenkénti CD 31-pozitív kapilláris felületre vetítve határoztuk meg. A pericyta borítottság vizsgálatára sztereológiai módszert alkalmaztunk. Annak igazolására, hogy a kapillárisokon lévő α SMA-GFP pozitív sejtek valóban pericyták, immunhisztokémiai festéshez 1:200 neuron/glia-2 típusú antigén (NG2; Chemicon/Millipore, Billerica, MA) poliklonális nyúl antitestet, valamint 1:200 arányban patkány anti-egér vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR)- β (eBioscience, San Diego, CA) antitestet használtunk. A metszeteket elsődleges antitestben inkubáltuk 42 órán keresztül, 6 \times 15 percig mostuk 1 \times TBS-ben (1% Triton X-100), 3 órán át inkubáltuk 1:200 számár anti-nyúl DyLight 549-ben (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) vagy kecske patkányellenes TRITC (Abcam)-ben. Az adott immunszignálok által elfoglalt területeket MetaMorph szoftverrel (7.7.9.0 verzió) elemeztük. A pericyta lefedettséget a α -SMA-GFP-pozitív és CD31-pozitív területek/CD31 pozitív területek számításával kvantifikáltuk, %-ban. Minden állatnál 4 véletlenszerűen kiválasztott hippocampális látóteret elemeztünk 6 nem szomszédos metszetben, csoportonként 6 állatban.

Kapilláris denzitás meghatározása

CD31 immunfluoreszcens jelölést (lásd fent) használtunk az agyi kapillárisok azonosítására [272]. Sztereológiai módszerekkel számszerűsítettük a hippocampus CA1, CA3, gyrus dentatus(DG), retrosplenialis cortex (RSA), primer szomatoszenzoros kéreg (S1) és corpus callosum (cc) kapilláris-sűrűségét (NeuroLucida és AutoNeuron (MicroBrightField, Williston, VT). A kapillárisok teljes hosszát (mm) elosztottuk a vizsgált agyszövet térfogatával (mm³).

Microglia aktiváció

Iba1 és CD68 immunfluoreszcens jelölést (lásd fent) alkalmaztuk az agyban lévő microglia és aktivált microglia sejtek azonosítására. Kiszámoltuk az Iba1-pozitív sejtek és a CD68-pozitív aktivált sejtek számát a hippocampusban. Minden állatnál 4 véletlenszerűen kiválasztott hippocampális látóteret elemeztünk 6 nem szomszédos metszetben. Csoportonként 6 állatot elemeztünk.

Gyulladásos cytokinek/kemokinek génexpressziós vizsgálata a hippocampusban

A microglia aktiváció számszerűsítése mellett számos neuroinflammatorikus cytokin/kemokin kifejeződését elemeztük kvantitatív RT-PCR-rel, gyorsfagyasztott hippocampális mintákból izolált RNS felhasználásával. A teljes RNS-t RNeasy Mini kittel (Qiagen) izoláltuk automatizált QIAcube-alapú platformon. A gyulladásos génexpressziót a TaqMan® Gene Signature valós idejű PCR-array (Mouse Immune Array és Alzheimer's Array; Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA) segítségével határoztuk meg.

Microglia-eredetű gyulladásos faktorok meghatározása a hippocampusban

A neuroinflammáció további jellemzésére a microglia-eredetű pro-inflammatorikus faktorok (MCP-1, TNF α , IP-10) fehérjeszintjét határoztuk meg hippocampus homogenizátumban mágneses „bead” array-vel (Millipore, Billerica, MA). Normalizálás céljából a minta fehérjetartalmát spektrofotometriás kvantifikációs módszerrel határoztuk meg BCA reagens felhasználásával (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Hippocampális 3-nitrotirozin fehérje meghatározás

A hippocampális oxidatív/nitrozatív stressz markereként a 3-nitrotirozin szintet hippocampus homogenizátumban az OxiSelect Protein Nitrotyrosine ELISA Kits (Cell Biolabs) segítségével mértük meg.

Statisztikai analízis

Az adatokat két-tényezős varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey post-hoc teszttel, valamint Pearson korrelációs teszttel elemeztük. A 0,05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag \pm S.E.M.-ként fejezzük ki.

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

Súlyos traumás agykárosodás patkányban (kontrollált impakt akcelerációs modell)

Valamennyi eljárást a Baranya Megyei Kormányhivatal Agrárügyi Főosztály Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Osztálya hagyta jóvá. Wistar-Kyoto patkányokban (hím, 300-350 g, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) a Marmamou-féle kontrollált impakt akcelerációs modellel hoztunk létre súlyos koponya-agy sérülést [273]. Röviden, izoflurán (2%) anesztézia alatt a fejbőrt a lambda és a bregma között a középvonalban bemetszettük, a koponyára egy acél korongot rögzítettünk fogászati akrillal. Egy 450 g-os súlyt 1,5 méteres magasságból ejtettünk a korongra, ami súlyos diffúz traumás agysérülést okozott az állatoknak. A halálozási arány 15% volt. A túlélő állatokból 2 és 24 órával a TBI után az a. cerebri media disztális szegmentumait izoláltuk, a VI.1.-ben leírtak szerint.

Izolált arteria cerebri mediából (MCA) származó, disztális szegmentumok nyomás-indukálta válaszainak vizsgálata

Súlyos diffúz koponya traumát elszenvedett patkányokat 24 órával a trauma után, valamint kontroll patkányokat elaltattunk, decapitáltuk, az agyukat eltávolítottuk, majd mikrosebészeti eszközökkel operációs mikroszkóp alatt izoláltuk az MCA-k disztális szegmenseit, amelyeknek myogén válaszait regisztráltuk az intraluminális nyomás fokozatos növekedésére nyomásmiográfiával. A VI.1.-ben leírt protokolloknak megfelelően az erek 60 perces inkubációja és spontán myogén tónus kifejlődése után a myogén válaszokat az intraluminális nyomás (0 és 140 Hgmm közötti) fokozatos (20 Hgmm-es lépésekben, egyenként 5 perces) növekedésére adott válaszként, az érátmérő változásának rögzítésével kaptuk. A mitokondriális ROS szerepének tisztázására ezt követően mitokondriális antioxidáns mitoTEMPO-t (3×10^{-8} mol/L, n=5) adtunk az érkamrába, és 30 perc elteltével újraértékeljük a myogén válaszokat. Egy másik kísérletsorozatban a vaszkuláris hidrogén-peroxid (H_2O_2) vízzé és oxigénné bomlását katalizáló PEG-kataláz (CAT, 120 U/ml) jelenlétében inkubáltuk az ereket, majd megismételtük a myogén válaszok kiváltását. A BK_{Ca} és TRPV4 csatornák TBI-indukálta myogén diszfunkcióban betöltött szerepének tesztelésére az MCA-k nyomás által indukált válaszait paxillin (a kalcium-aktivált káliumcsatornák specifikus blokkolója, 10^{-6} mol/l 20 percig) és a specifikus TRPV4-blokkoló HC067047 ($0,5 \times 10^{-6}$ mol/l 20 percig) jelenlétében megismételtük. Annak tesztelésére, hogy a H_2O_2 aktiválja-e a BK_{Ca} és TRPV4-

csatornákat, az MCA-k dózisfüggő dilatációját indukáltuk H_2O_2 hatására paxillin és HC067047 jelenlétében. Annak vizsgálatára, hogy a TRPV4-csatornák által kiváltott dilatációban BK_{Ca} szerepet játszik-e a TRPV4-agonista GSK1016790A által dózisfüggő dilatációt váltottunk ki MCA-ban paxillin hiányában és jelenlétében. Minden gyógyszert a SigmaAldrich Hungary-tól (Budapest, Magyarország) vásároltunk. Minden kísérlet végén meghatároztuk a passzív nyomás-átmérő görbéket Ca^{2+} mentes Krebs oldat, valamint nifedipin jelenlétében. Az egyes nyomáslépésekre adott átmérő-válaszok a 80 Hgmm-nél mért passzív átmérő érték százalékaként vannak bemutatva.

A vaszkuláris H_2O_2 termelés vizsgálata: CM- H_2 DCFDA festés és konfokális mikroszkópia

A traumás agysérülés utáni cerebrovaszkuláris H_2O_2 termelés kimutatására CM- H_2 DCFDA (DCF, SigmaAldrich Hungary, Budapest) sejtpermeábilis oxidatív fluoreszcens indikátorfestéket és konfokális mikroszkópot használtunk. Röviden, az izolált MCA-kat oxygenizált Krebs-pufferrel töltött mikroplate-ekre helyeztük, és CM- H_2 DCFDA-val (5 μ M, 37 °C-on 10 percig) inkubáltuk [274]. Ezután a mintákat átmostuk, majd tárgylemezre helyeztük, lefedtük. Laser scanning konfokális mikroszkópot (Olympus Fluoview FV1000) használtunk a CM- H_2 DCFDA fluoreszcencia megjelenítésére. A fluoreszcencia intenzitását a kontroll erekhez viszonyított változásként fejeztük ki. Egy másik kísérletsorozatban megismételtük a fenti protokollokat kataláz jelenlétében (120 U/ml 20 percig).

Kvantitatív real-time RT-PCR

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk a KCNMA1 és KCNMB1 (a BK_{Ca} -csatornák α és β alegységei) és a TRPV4 mRNS expressziójának elemzésére kontroll és TBI-n átesett patkányok izolált agyi artériáiban.

Cerebrovaszkuláris simaizom sejtek (VSMCs) izolálása

A kísérletek WKY patkányok felhasználásával a University of Mississippi Medical Centerben történtek, az American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care engedélyével Dr. Mallikarjuna R. Pabidi laboratóriumában. Az állatokat 4%-os izofluránnal túlaltattuk, az MCA-kat mikrosebészeti eszközökkel izoláltuk, majd alacsony kalcium-disszociációs oldatban emésztettük (mM-ben: 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0,05 CaCl₂ és 10 glükóz, pH 7,4). Az ereket kis darabokra vágtuk, 1000 fordulat/perc sebességgel 1 percig centrifugáltuk, majd papaint (50 egység vagy 2 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) és ditiotreitolt (2 mg/ml) tartalmazó disszociációs oldatban inkubáltuk 10-15 percig 37°C-os

vízfürdőn. A részben elemésztett ereket 1000 fordulat/perc sebességgel 1 percig centrifugáltuk, majd a pelletet mosás után albumint (1 mg/ml) és kollagenázt (250 egység/ml vagy 2 mg/ml) tartalmazó friss disszociációs oldatban újra szuszpendáltuk, majd 10-15 percig inkubáltuk. A VSMC-eket az emésztett szövet óvatos pipettázásával tápközegbe helyeztük. A felülúszót összegyűjtöttük, és a sejteket 1 percig 1000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással ülepítettük. A sejteket alacsony Ca^{2+} -disszociációs oldatban újra szuszpendáltuk, és 4 °C-on tartottuk. A patch-clamp kísérleteket a sejtek izolálását követő 4 órán belül végeztük (minden csoportban 4 patkány 2-3 simaizomsejtjét vizsgáltuk 8-12 sejt /csoport).

Teljes sejt patch-clamp vizsgálat cerebrovaszkuláris simaizom sejteken

A BK_{Ca} csatorna áramokat VSMC-ből egész sejt patch-clamp módszerrel vizsgáltuk, szobahőmérsékleten (22-23 °C). A fürdőoldat összetétele mM-ben: 130 NaCl, 5 KCl, 1,8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES és 10 glükóz (pH 7,4). A pipettákat a következő oldattal töltöttük meg: 130 K glükonát, 30 KCl, 10 NaCl, 1 MgCl_2 és 10 HEPES (pH 7,2). A pipettaoldatban az EGTA és a Ca^{2+} koncentrációját úgy állítottuk be, hogy a citoszolban 100 nM szabad Ca^{2+} -koncentrációt kapjunk (C. Patton (Stanford University Pacific Grove, California, USA) által írt WinMAXC szoftver segítségével). A pipettákat 1,5 mm-es boroszilikát üvegapillárisokból kétlépcsős mikropipetta húzóval (P-97 modell; Sutter Instrument, San Rafael, CA) készítettük, hőkezeltük. A pipetták hegyének ellenállása 2-8 M Ω volt. Miután a pipetta hegyét egy adott sejt felszínére helyeztük, 5-20 G Ω -os szigetelési ellenállás alakult ki, majd a membránt üvegfecskendő finom szívásával szakítottuk át. Axopatch 200B erősítőt (Axon Instruments, Foster City, CA) használtunk a pipettapotenciál és a teljes sejtáramok rögzítésére. Az „outward” membrán K^+ áramot 20 mV-os feszültséglépések sorozatával (-60-tól +120 mV-ig) indukáltuk. Az erősítő kimeneti jelét 2 kHz-en szűrtük nyolcpólusú Bessel-szűrővel. Az áramokat p-CLAMP szoftverrel (Axon Instruments) rögzítettük 10 kHz-es frekvenciával, majd egy számítógép merevlemezen tároltuk offline elemzés céljából. Az adatok elemzését Clampfit szoftverrel (10.0-s verzió, Axon Instruments) végeztük. A csúcsáram amplitúdóit 5-10 próba átlagából határoztuk meg. A membrán kapacitanciát pico faradokban (pF) 30 áram átlagából határoztuk meg, amelyeket egy 5 mV-os impulzus váltott ki. A csúcsáramokat (pA-ban) áramsűrűségként (pA/pF) fejeztük ki (normalizálva a VSMC-k méretbeli különbségeit). H_2O_2 -t (10 μM), Paxilline-t (Pax, 100 nM) és 4-aminopiridint (4-AP, 1 mM) adtunk a fürdőoldathoz a BK_{Ca} és TRPV4 csatornák aktiválására, illetve gátlására.

Statisztikai analízis

Az adatokat Student t-tesztel vagy ANOVA-val elemeztük (Tukey post hoc tesztet használva a többszörös összehasonlításhoz), a 0,05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag \pm S.E.M. formában adjuk meg.

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

Enyhe koponya trauma normotenzív és hipertóniás patkányokban, valamint SS-31 kezelés

Valamennyi eljárást a Baranya Megyei Kormányhivatal Agrárügyi Főosztály Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Osztálya hagyta jóvá. A spontán hipertóniás patkányokat (hím SHR, 300-350 g, n=25) és az életkoruknak megfelelő normotenzív Wistar patkányokat (hím Wistar, 300-350 g, n=15) a Janvier Labs-tól (Le Genest-Saint-Isle, Franciaország) és a Toxi-Coop-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az enyhe koponya-agy sérülést (mTBI) a Marmamou-féle kontrollált impakt akcelerációs modellel hoztuk létre, a fent leírtaktól eltérően azonban 450 g-os súlyt 200 mm magasságból ejtettük az állatok fején rögzített acél korongra. Minden állat túlélte az eljárást. Az állatokat a trauma után vagy vivőanyaggal (fiziológiás sóoldat) vagy antioxidáns SS-31 tetrapeptiddel (elamipretide; 5,7 mg/Kg/nap, i.p., fiziológiás sóoldatban oldva) kezeltük 14 napig [160]. Az Szeto-Schiller (SS) vegyület (SS-31) egy alternáló aromás-kationos aminosav szekvenciával (H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂) rendelkező tetrapeptid, amely a belső mitokondriális membránban több mint 1000-szeres koncentrációban halmozódik fel a citoszolhoz képest [275]. A kezelés előtt és után a vérnyomás értékeket farokmandzsetta alkalmazásával mértük.

Reaktív szabad gyökök (ROS) és mitokondriális szabad gyökök (mtROS) meghatározása izolált arteria cerebri mediában

Két héttel az mTBI után a patkányokat túlaltattuk, decapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk, majd az MCA-k disztális szegmenseit operatív mikroszkóp alatt izoláltuk. Az agyi artériák falában a citoszol ROS termelésének jellemzésére dihidroetidium (DHE) fluoreszcens módszert alkalmaztunk. A mitokondriális oxidatív stressz vizsgálatához MitoSOX Red-et, egy mitokondrium-specifikus hidroetidín-származék fluoreszcens redox indikátor festéket használtunk [232]. Röviden, az artéria szegmenseket nem oxidált DHE-t (10 μ M/L; Sigma Aldrich Hungary, Budapest) vagy MitoSOX-ot (10 μ M/L, Thermo Fisher

Scientific, Life Technologies, Budapest, Magyarország) tartalmazó Krebs oldatba helyeztük és 30 percig fénytől védve inkubáltuk 37 °C-on. Egy másik kísérletsorozatban az izolált ereket előkezeltük NADPH-oxidáz inhibitor apocininnel (10 mM/L 90 percig; Sigma Aldrich Hungary, Budapest). Inkubálás után az ereket Krebs-pufferben mostuk 3x15 percig. Ezután az MCA-kat tárgylemezre helyeztük, lefedtük, és laser scanning konfokális mikroszkóppal (Olympus Fluoview FV1000, gerjesztés 488 nm, emisszió 540 és 640 nm között) vizsgáltuk. Az artériák átlagos fluoreszcencia intenzitását az endothel és simaizomrétegeket külön mérve az Image J szoftverrel számszerűsítettük, az eredményeket a kontroll állatokhoz viszonyítva adjuk meg.

Kvantitatív real-time RT-PCR

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk a NADPH-oxidáz *Nox4* alegység vizsgálatára.

Statisztikai analízis

Az adatokat ANOVA-val elemeztük (Tukey post hoc tesztet használva a többszörös összehasonlításához), a 0,05-nél kisebb *p* értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag±S.E.M. formában adjuk meg.

VI.4. A nyomás-indukált cerebrovaszkuláris konstriktor és dilatátor útvonalak közötti interakció: agyi erek autoregulációs működése súlyos koponya trauma után egyidejű magasvérnyomás betegség jelenlétében

Súlyos traumás koponya-agy károsodás normotenzív és hipertóniás patkányokban

Valamennyi eljárást a Baranya Megyei Kormányhivatal Agrárügyi Főosztály Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Osztálya hagyta jóvá. A spontán hipertóniás patkányokat (SHR, 300-350 g, n=12) és az életkornak megfelelő normotenzív Wistar Kyoto patkányokat (WKY, 300-350 g, n=12) a Charles River Laboratories-tól (Wilmington, MA, USA) vásároltuk. A súlyos koponya-agy sérülést (TBI) a Marmamou-féle kontrollált impakt akcelerációs modellel hoztuk létre, a korábbi fejezetekben leírtaknak megfelelően (450 g-os súly alkalmazása 1.5 m magasságból). A halálozási arány 15% volt. A vérnyomást minden állatcsoportban farokmandzsetta használatával mértük. Az arteria cerebri media-kat a korábban leírt módon izoláltuk a trauma után 24 órával további *in vitro* kísérletekhez.

Normotenzív és hiperóniás patkányokból izolált arteria cerebri media (MCA) nyomás-indukálta myogén válaszai súlyos koponya-agy sérülés után

Az SHR-ek és WKY-k izolált MCA-inak nyomás által kiváltott átmérő válaszait nyomásmiográf segítségével határoztuk meg 24 órával a súlyos TBI után, a korábban leírtaknak megfelelően. A 20-HETE szerepének felmérésére HET0016-ot alkalmaztunk (citokróm P450 ω -hidroxiláz inhibitor, 10^{-6} mol/l, 30 percig, a Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Külön kísérletekben vizsgáltuk agyi artériák összehúzódási képességét, ehhez baziláris artériák szegmentumait használtuk, gyűrűpreparátumok izometrikus válaszait vizsgáltuk U46616 vazokonstriktor adásával szemben (TXA₂ receptor agonista, 10^{-7} mol/L) DMT drót-miográf segítségével, a korábban leírtak szerint[269]. Minden kísérlet végén a passzív átmérőgörbéket (0-180 Hgmm) meghatároztuk Ca²⁺-mentes, nifedipint (10^{-5} mol/L) tartalmazó Krebs puffer jelenlétében. Myogén tónust számoltunk a következők szerint: $[(D_P - D_A)/D_P] \times 100$, ahol D_P a passzív átmérő, a D_A pedig az izolált MCA aktív átmérője adott intraluminális nyomáson.

Kvantitatív real-time RT-PCR

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk a 20-HETE-t termelő *Cyp4a1* és *Cyp4a3* citokróm izoformok mRNS expressziójának vizsgálatára az egyes csoportok patkányainak MCA-jában.

Statisztikai analízis

Az adatokat két-tényezős varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey post-hoc teszttel analizáltuk, a 0,05-nél kisebb *p* értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag \pm S.E.M. formában adjuk meg.

VI.5. A neurovaszkuláris kapcsolat szerepe a kognitív funkcióban

A kísérleti protokollokat a Institutional Animal Use and Care Committee of the University of Oklahoma Health Sciences Center hagyta jóvá.

Kísérleti állatok és farmakológiai kezelés

Hím C57BL/6J egereket (5 hónaposak, n=100) a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME) vásároltuk. A vizsgált állatokat két csoportba soroltuk: 1) az egyik csoport állatai farmakológiai inhibitorokat kaptak a neurovaszkuláris kapcsolatban részt vevő mediátorok (NO, EET-k és prosztaglandinok) termelésének blokkolására, és 2) a kontroll állatok, amelyek

vivőanyagot kaptak. Az EET-termelés gátlására az egereket N-(metil-szulfonil)-2-(2-propinil-oxi)-benzol-hexánamiddal (MS-PPOH) kezeltük, amely az EET-termelő epoxidázok specifikus inhibitora [276]. Ennek megfelelően a korábban már leírt Alzet ozmotikus minipumpákat (7 nap - 1 µl/óra, ~200 µl össztérfogat, katalógusszám: 2001; Durect Corp., Cupertino, CA) MS-PPOH-val (20 mg/kg/nap, DMSO-ban oldva, hígítva 45% ciklodextrinnel [276]) töltöttük meg és szubkután beültettük. Az értágító NO képződésének blokkolására az MS-PPOH-t tartalmazó pumpákkal ellátott egereket NO-szintáz inhibitor L-NG-Nitroarginin-metil-észterrel (L-NAME, 100 mg/kg/nap; ivóvízben) kezeltük [260]. Indometacint (7,5 mg/ttkg/nap, p.o.), a ciklooxygenázok nem szelektív inhibitorát alkalmaztuk a ciklooxygenáz eredetű értágító arachidonsav metabolitok termelésének blokkálásra. Az indometacint etanolban oldottuk, 5%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal hígítottuk. Az etanol maximális napi mennyisége 3 µl volt állatonként. A kezeléseket a kísérlet teljes időtartama alatt (7 nap) folytattuk. Az állatok vérnyomását a kezelés előtt és a kezelési periódus 3. napján rögzítettük a farokmandzsettás módszerrel.

Viselkedési vizsgálatok

Miután az állatok teljesen felépültek a sebészi beavatkozásból (posztoperatív 3. nap), viselkedési tesztekét végeztünk tanulás, memória, a szenzoros-motoros funkció és a járás koordináció vizsgálatára.

A térbeli memória felmérése Y maze-el

A Y maze (labirintus) három zárt átlátszó plexi karból állt, extra vizuális jelzésekkel a labirintus körül. A teszt két, 4 óra különbséggel elvégzett kísérletből állt. A labirintust a kísérletek között 70%-os etanollal mostuk le. Az egereket saját ketrecükben vittük a vizsgáló helyiségbe, legalább 1 órával a tesztelés előtt. Az első akvizíciós kísérletben az egereket a labirintusba helyeztük az egyik, véletlenszerűen kiválasztott kar zárt végével szemben, és hagytuk, hogy 5 percig felfedezzék a labirintust az egyik kar zárt állapota mellett (új kar). Az egereket visszahelyeztük a ketrecükbe a második kísérletig. A második teszt során szabadon felfedezhették a labirintus mindhárom karját. Az egyes karokban eltöltött időt és a belépések számát videofelvétel segítségével mértük és elemeztük (Ethovision, Noldus Information Technology Inc. Leesburg, VA). Ha az adott állat gyakrabban és hosszabb ideig lépett be az új karba, akkor az megtartott emlékezetet és újdonságkereső viselkedést jelez.

Új tárgy felismerési teszt (Novel object recognition test)

A felismeréshez használt memória funkció értékeléséhez az új tárgy felismerési tesztet használtuk. A teszt eredményeit a hippocampalis és a corticalis károsodás egyaránt befolyásolja [277]. A teszt egy habituációs, egy megismerési és egy vizsgálati fázisból állt. A kísérletek között az arénát és a tárgyakat 70%-os etanollal tisztítottuk, hogy elkerüljük a szagokból eredő hibát. A habituációs szakaszban az állatok 5 percig vizsgálhatták az üres arénát. Ezután a megismerési fázisban az egerek két azonos tárgyat fedezhettek fel 2 percig. 4 óras késleltetés után a vizsgálati fázisban az állatok 2 percig vizsgálhatták az egyik, már ismerős tárgyat és egy új tárgyat. Az minősült a tárgyak vizsgálatának, ha az állat orra ≤ 2 cm-re volt a tárgytól, és/vagy azt megérintette. A tárgyra ülés vagy mászás nem számított felfedezésnek-vizsgálódásnak. A használt objektumok mosható, szagtalan műanyagból készültek, különböző formájúak és színűek, de azonos méretűek voltak. Az új objektum felfedezésére fordított idő százalékát a két objektum felfedezésére fordított teljes időhöz viszonyítva használtuk az új objektum felismerésének mértékeként. A Recognition Index volt a memória fő jelzőszáma, azt a következő képlet szerint számítottunk ki: $RI = T_{\text{novel}} / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$ [277].

„Elevated plus maze” tanulási protokoll

A tanulási kapacitás meghatározására „Elevated plus maze” tanulási protokollt használtuk a korábbi fejezetekben leírtaknak megfelelően.

Rotarod

A motoros koordinációt egy automata négysávós rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH) segítségével értékeltük. Az egereket úgy tréningeltük a vizsgálatra, hogy 120 mp-ig a 10 fordulat/perc sebességgel mozgó rotarodra helyeztük őket. A vizsgálat napján az egerek saját ketrecükben legalább 15 percig akklimatizálódtak a vizsgáló helyiségben. A tesztfázis három kísérletből állt, amelyeket 15 perces intervallum választott el. A vizsgálóberendezést úgy állítottuk be, hogy 4-ről 40/perc fordulatszámra gyorsuljon 300 másodperc alatt. Ezután mindegyik sávra egy egeret helyeztünk, és a rotarodot 4 fordulat/perc kezdeti forgással elindítottuk. A forgási sebesség 10 másodpercenként növekedett, ennek megfelelően feljegyeztük az adott sebességnél bekövetkező, kiesésig eltelt időt (latencia). A latenciát másodpercekben adtuk meg [278].

Grip strength

A neurovaszkuláris szét-kapcsolás statikus erő kifejtésre gyakorolt hatásának értékelésére az elülső végtagok szorítóerejét elektronikus húzófeszültség-mérővel (Grip Strength Meter-Columbus Instruments, Columbus, OH) határoztuk meg.

Ragasztó-szalag eltávolítási teszt

A szenzomotoros funkciót a ragasztó-szalag eltávolítási teszttel is jellemeztük [279]. Két előre levágott négyzet alakú szalagdarabot helyeztünk az állatok elülső mancsaira, hogy lefedjük az elülső mancsok szőrtelen részét. Miután az öntapadó négyzeteket egyenlő nyomással mindkét mellső mancsra helyeztük, az állatokat visszahelyeztük a ketrecbe, és megmértük, hogy az egerek milyen hosszú idő alatt távolították el a szalagokat. A maximális várakozási idő 120 másodperc volt.

Elrejtett táplálék megtalálása

A szaglás és gusztatoros motiváció vizsgálatára az elrejtett táplálék megtalálási tesztet végeztük el. Tápanyag-deprivált egereket egy olyan ketrecbe helyeztük, amelyben táplálékot rejtettünk az alom alá. A megtalálásig eltelt időt mértük (maximum 5 perc). A tesztet 1 óra elteltével megismételtük a táplálék jól látható helyen történő elhelyezésével, hogy kizárjuk a motoros deficitet, illetve az egyéb irányú motivációs hiányt.

A járás-koordináció vizsgálata

A járás-koordináció vizsgálatára a CatWalk rendszert használtuk (Noldus Information Technology Inc. Leesburg, VA). A CatWalk használata során a mancsnyomok méretének, nyomásának és mintázatának felismerése történik önkéntes futás közben egy alulról megvilágított üveg korridorban. Az üvegfelület alá helyezett kamera segítségével automatizált elemzés történik a járás funkcióról, valamint a végtagok közötti koordináció térbeli és időbeli vonatkozásairól [280]. Az állatokat kondicionáltuk, hogy átfussanak a korridoron, majd egy sötét, csendes szobában az állatok három egymást követő futását vizsgáltuk, az adatokat átlagoltuk. Az egyes lábnyomok kézi azonosítása és címkézése után a következő paramétereket számítottuk ki: a regulatory index (%) a végtag mozgás koordinációjának mérőszáma, amely a normál lépéssorozat-mintázatok számát fejezi ki a mancsok összes elhelyezésének számához viszonyítva ($NSSP \times 4 / PP \times 100$ (%), ahol az NSSP a normál lépéssorozat minták számát, a PP pedig a mancsok összesített elhelyezését jelenti). Egészséges, teljesen koordinált állatokban értéke 100%. A „phase dispersion” a végtagok egymáshoz képesti koordinációjának kvantitatív

mérőszáma. Egy lépésciklusban a „base of support” az elülső lábnyomatok középpontjai közötti távolságot adja meg.

A neurovaszkuláris kapcsolás mérése: a neuronális aktivációt követő lokális véráramlás és az extracelluláris glükóz változásának regisztrációja

A viselkedési vizsgálatok után az egereket elaltattuk (α -kloralóz (50 mg/kg, i.p.) / uretán (750 mg/kg, i.p.), endotracheálisan intubáltuk és lélegeztettük (MousVent G500; Kent Scientific Co, Torrington, CT). Termosztatikus fűtőpárnát (Kent Scientific Co, Torrington, CT) használtunk a rectális hőmérséklet 37 °C-on tartására [163]. A kilégzés végi CO₂-t (beleértve a holtteret is) 3,2% és 3,7% között szabályoztuk, hogy a vérgáz értékek a fiziológiás tartományon belül maradjanak (PaCO₂: 37,1±2,4 Hgmm, PaO₂: 110,8±3,5 Hgmm). A jobb femorális artériába kanült helyeztünk az artériás vérnyomás méréséhez (Living Systems Instrumentations, Burlington, VT) [163]. A vérnyomás végig a fiziológiás tartományon belül volt (90-110 Hgmm). Az egereket sztereotaxiás keretre helyeztük (Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, IL), a fejbőrt és a csonthártyát a középvonalban felvagtuk, félrehúztuk, majd a jobb bajuszpárnát 30 másodpercig 5 Hz frekvenciával stimuláltuk, miközben az agyi véráramlás (CBF) változásait a bal szomatoszenzoros kéreg fölött mértük (a bregmától 1,5 mm caudálisan és a középvonaltól 3 mm-re laterálisan) laser Doppler transzducerrel (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY). A CBF változásokat négy egymást követő, 5-10 perces időközökkel elválasztott stimuláció során mértük, átlagoltuk, majd az alap véráramlási érték százalékában (%) fejeztük ki a növekedést [188]. További kontroll, nem kezelt állatokon a szomatoszenzoros kéregnek megfelelően akut koponya ablak preparátumot készítettünk, majd a perfundált cortexre topikálisan MS-PPOH-t (2×10^{-6} mol/l 30 percig), L-NAME-t (3×10^{-4} mol/l) és indometacint (10^{-5} mol/l 30 percig) juttattunk, majd a neurovaszkuláris stimulációt megismételtük.

Egy külön állatcsoportban vizsgáltuk a szomatoszenzoros kéreg extracelluláris glükóz koncentrációjának ([glükóz]_{ec}) változását a bajusz-stimuláció hatására. Mivel az agyban nincsenek jelentős glükóztartalékok, a neurovaszkuláris kapcsolás kritikus szerepet játszik a glükózellátás növelésében a neuronális és astrocyta aktiváció során [281]. Így a [glükóz]_{ec} neuronális aktiváció során bekövetkező változásainak mérése, amelyet a sejtek felhasználása és a CBF változása közötti egyensúly határoz meg, felhasználható az agyi funkcionális hiperémia metabolikus paramétereként. A fent leírt módon altatott egereken akut koponya ablakot készítettünk, a durát óvatosan eltávolítottuk. A koponya ablakot folyamatosan arteficiális cerebrospinális folyadékkal (ACSF) perfundáltuk. Ezt követően glükóz

mikroszenzort helyeztünk a szomatoszenzoros kéregbe, és mértük az extracelluláris glükóz koncentrációját jellemző áramerősség változást bajusz stimuláció során 3 elektródás potenciosztáttal (Quadstat) és eDAQ adatgyűjtő rendszerrel (eDAQ Pty Ltd., USA, CO). Használat előtt a glükóz szenzort (Sarissa GLU Biosensor, 25 μm -es csúcs, Sarissa Biomedical, Coventry, UK) [282] a gyártó utasításai szerint *in vitro* kalibráltuk, majd a bregmától 1,5 mm-re caudálisan és a középvonaltól 3 mm-re laterálisan 500 μm mélyen az agyszövetbe helyeztük. A glükózszenzor egy platina/iridium elektróda, amelyet egy glükóz-oxidáz réteg borít, így védett az aszkorbáttal, uráttal, dopaminnal és 5-hidroxi-triptaminnal való interferencia ellen. A D-glükóz D-glükono-1,5-laktonná és hidrogén-peroxidá oxidálódik, amelyet az elektróda érzékel. Egy másik kísérletsorozatban glükóz null szenzorokat (a bioszenzorhoz szükséges enzimek nélkül) használtunk kontrollként. A referenciaelektrodát (Ag/AgCl) az agyszövet más pontján, a segédelektrodát (Ag/AgCl) pedig a fejbőr és a koponya között helyeztük el. A referencia elektródával szembeni konstans 0,5 V potenciált használtunk. A behelyezést követően 5-10 perc alatt stabil alapvonal alakult ki. Ezután a jobb bajuszpárnát 2 percig stimuláltuk 5 Hz-en 2 egymást követő etap-ban, 5-10 perces időközökkel elválasztva. A választ μA -ban rögzítettük, és a kalibrációs görbe segítségével mmol/l glükózra konvertáltuk.

Szomatoszenzoros kiváltott válasz vizsgálatok

Annak meghatározására, hogy az NO, az EET-k és a prosztaglandinok szintézisének farmakológiai gátlása primer neuronális diszfunkciót eredményez-e, meghatároztuk a kiváltott szomatoszenzoros mezőpotenciál válaszok (evoked field potential) nagyságát kontralaterális bajusz-párna stimulációt követően. Az egereket (n=6) a fent leírtak szerint sebészileg előkészítettük és lélegeztettük. Ezután az akut koponya ablakon keresztül üvegszigetelt volfrám mikroelektrodát (impedancia, 2-3 M Ω , Kation Scientific, LLC, Minneapolis, MN) helyeztünk a bal szomatoszenzoros kéregbe (bregmától caudálisan 1.5 mm, középvonaltól laterálisan 3 mm, 0,6 mm mélyen). Az ACSF-perfundált nyitott koponyaablakon keresztül a helyi potenciálok rögzítéséhez a nyakizmokba behelyezett Ag/AgCl elektróda szolgált referenciaként. A bazális aktivitás felvétele után a jobb oldali bajuszpárnát a trigeminus ramus infraorbitalisához és a rágóizmokba helyezett bipoláris stimuláló elektródával stimuláltuk (áram: 0,2 mA, impulzus időtartama: 0,3 ms, 2 Hz-en 30 másodpercig). A jelet AC/DC differenciálerősítővel erősítettük fel (1 Hz-en felül és 1 kHz-en alul áteresztő) (Model 3000, A-M Systems, Inc. Carlsborg, WA) és PowerLab/Labchart adatgyűjtő rendszerrel (ADInstruments, Colorado, Springs, CO) digitalizáltuk, 40 kHz mintavételi frekvenciával. Az elemzéseket 10 stimulációs kísérlet átlagán végeztük el. A szomatoszenzoros kiváltott

mezőpotenciál válasz negatív amplitúdóját az excitatórikus posztszinaptikus potenciálnak (fEPSP) tekintettük[283].

Arterial spin labeling kísérlet MRI vizsgálatok agyi perfúzió mérésére

A neurovaszkuláris kapcsolást gátló szerek bazális CBF-re gyakorolt hatásának jellemzésére kontroll- és kísérleti egerek csoportján (n=10 csoportonként) perfúziós MRI vizsgálatokat végeztünk. Az állatokat izofluránnal, arcmaszk használatával altattuk, a légzésszám fiziológiás tartományban tartása mellett [284]. A testhőmérsékletet ~ 37 °C-on tartottuk fűtőpárna segítségével. Egy 7 T térerejű Bruker Biospin készüléket használtunk (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Németország) aktívan lecsatoló fej-tekerccsel. A rezonátortekercs egy 72 mm belső átmérőjű tekercs volt. Többszeletes, többszörös echo (MSME) képalkotást (TR=2000 ms, TE=17,5 vagy 58,2 ms, 156 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, 2 átlag) használtunk a durva agymorfológia meghatározásához. A perfúziós térképeket az agy egyetlen axiális szeletéről készítettük, amely a rostro-caudalis tengelyen a bregmától 1,5 mm-rel hátra helyezkedett el. A perfúziós kontraszt eléréséhez áramlás-alternáló inverziós visszaállási sémát alkalmaztunk. A longitudinális vissza állási (recovery) arányokat használtuk fel az agyi perfúzió képpontonkénti kiszámítására (CBF: $\text{ml}/(100\text{g}\cdot\text{min})$), a következő összefüggés alapján: $\text{CBF} = \lambda \cdot [(1/T1^*) - (1/T1)]$ [285].

Szinaptikus potenciáldás mérése (long-term potentiation - LTP) agyszeleteken

Annak megállapítására, hogy a gyógyszeres kezelés megzavarta-e a tanulás és a memória neuronális mechanizmusait, extracelluláris méréseket végeztünk akut hippocampalis agyszeletekben a korábban publikált protokollok szerint [286]. Röviden, 325 μm vastagságú horizontális hippocampális szeleteket készítettünk HM650V vibrációs mikrotommal jéghideg szacharóz 110, NaCl 60, KCl 3, NaH_2PO_4 1,25, NaHCO_3 28, nátrium-aszkorbát 0,6, glükóz 5, MgCl_2 7, CaCl_2 0,5 (mmol/l) összetételű oldatban. A szeleteket ezután egy tartókamrába (Scientific Designs, Inc.) vittük át, amely oxigénnel dúsított mesterséges agy-gerincvelői folyadékot tartalmazott a következő összetételben (mmol/l): NaCl 126, KCl 2,5, NaH_2PO_4 1,25, MgCl_2 2, CaCl_2 2, NaHCO_3 26, glükóz 10, piroszőlősav 2, aszkorbinsav 0,4. Az EET, NO és prosztaglandinok szintézisének *in vitro* gátlására MS-PPOH-t (2×10^{-6} mol/l 30 percig), L-NAME-et (3×10^{-4} mol/L) és indometacint (10^{-5} mol/l 30 percig) használtunk. A szeleteket legalább 60 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd agyszelet-kamrába helyeztük (Automate Scientific Inc., CA). A kezelt és a kontrollcsoportból származó szeleteket P5002A többelektrodos tömbökre helyeztük (Alpha MED Scientific Inc, Japán), amelyeket ACSF-fel

perfundáltunk. Az excitatórikus posztszinaptikus potenciálokat (fEPSP) a perforáns pálya stimulálásával (0,2 msec kétfázisú impulzus) váltottuk ki a gyrus dentatusban. Meghatároztuk a fEPSP-k előidézésének küszöb értékét, majd az ingert fokozatosan növeltük, amíg el nem értük a fEPSP maximális amplitúdóját (I/O görbe). Az összes többi stimulációs paradigmát az I/O görbe által meghatározott, a maximális fEPSP amplitúdó kiváltásához szükséges inger 50%-val végeztük. Stabil alapvonal elérése után az LTP-t nagyfrekvenciás stimulációval (HFS) indukáltuk, amely 30 sec-os intervallumok által elválasztva 4 alkalommal leadott 100 impulzusból állt 100 Hz-en. Az fEPSP-eket 30 másodpercenként 60 percig figyeltük a HFS-t követően, MED-64 rendszerrel és Mobius szoftverrel (Alpha MED Scientific Inc.) rögzítettük. A potenciálódást a HFS-t követően az átlagos fEPSP csökkenő meredekségként (mint százalékos növekedés), az alapvonal felvételek átlagos fEPSP csökkenő meredekségére normalizálva fejeztük ki.

Statisztikai analízis

Az adatokat nem-páros *t* próbával, valamint két-tényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük, amit Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás követett. A 0,05-nél kisebb *p* értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, az adatokat átlag±S.E.M. formában adjuk meg.

VI.6. A neurovaszkuláris kapcsolás károsodása öregedésben: a cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szerepe és annak farmakológiai csökkentése

A kísérleti protokollokat az Institutional Animal Use and Care Committee of the University of Oklahoma Health Sciences Center hagyta jóvá.

Kísérleti állatok, resveratrol kezelés

Fiatal (3 hónapos, *n*=30) és idős (24 hónapos, *n*=30) hím C57BL/6 egereket a National Institute on Aging at Charles River Laboratories (Wilmington, MA) által fenntartott öreg kolóniából vásároltunk. Az egyes korcsoportok egerei két-két csoportba kerültek (*n*=15 csoportonként): standard AIN-93G diétával (*ad libitum*) vagy standard diéta kiegészítve resveratrollal (200 mg/kg/nap, 10 napon keresztül) [199, 201, 202].

Neurovaszkuláris kapcsolás mérése

A kísérleti csoportok állatainak neurovaszkuláris kapcsolását a fent leírtak szerint végeztük. Akut koponya ablak használatával a CBF válaszokat a következő drogok topikális adminisztrációját követően megismételtük: NADPH-oxidáz inhibitor apocynin (3×10^{-4} mol/L), nitrogén-monoxid szintáz inhibitor N ω -Nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME; 10^{-4} mol/L, 20 perc), és a muszkarin ACh receptor antagonistá atropin (10^{-5} mol). Az acetil-kolin (ACh; 10^{-5} mol/L) és adenzin (5×10^{-5} mol/L)-indukálta CBF válaszokat szintén meghatároztuk. A CBF változásait az alapértékhez képest százalékos (%) növekedésben fejezzük ki [188].

In vivo resveratrol kezelés cortikális oxidatív stressz markerekre gyakorolt hatásának meghatározása

A resveratrol kezelés redox homeosztázisra kifejtett hatásának jellemzésére a 3-nitrotirozin (3-NT, a peroxinitrit hatás markere) cortikális szintjét határoztuk meg szövet homogenizátumában a korábban leírtak szerint.

In vitro resveratrol kezelés hatásának vizsgálata endothel-sejt szabadgyök termelésére sejt kultúrában

A resveratrol közvetlen antioxidáns hatásának *in vitro* igazolására megvizsgáltuk a hatását a celluláris ROS termelésre primer cerebromicrovaszkuláris endothel sejtekben (CMVEC). A sejt tenyészetek létrehozásának pontos lépéseihez kérem az olvasót az azokat részletesen leíró publikációkban tájékozódni [287, 288]. A resveratrol kezelést követően (10 μ mol/L, 24 óra) a fiatal és öreg endothel sejteket CM-H₂DCFDA-val (10 μ M, at 37 °C, 30 perc) inkubáltuk, majd CM-H₂DCFDA fluoreszcenciát áramlási cytometriával határoztuk meg Guava easyCyte 8HT flow-cytometer (Millipore, Hayward, CA) használatával [289, 290].

Kvantitatív real-time RT-PCR

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk a *Nox1*, *Nox2*, *Nox4* and *Ncf1* (p47phox) corticális expressziójának vizsgálatához.

Statisztikai analízis

Az adatokat két-tényezős varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey post-hoc teszttel analizáltuk, a 0,05-nél kisebb *p* értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat $\bar{x} \pm S.E.M.$ formában adjuk meg

VI.7. Az inzulinszerű növekedési faktor hiánya neurovaszkuláris szét-kapcsolást okoz

A kísérleti protokollokat az Institutional Animal Use and Care Committee of the University of Oklahoma Health Sciences Center hagyta jóvá.

Máj-specifikus Igfl kondicionális knock-down egérben

Az *Igfl* gén flox-olt exonjára (*Igfl^{fl/fl}*) homozigóta hím egereket használtunk (C57BL/6 háttérrel) [33]. Ezekben az egerekben az *Igfl* gén 4. exonját teljes egészében loxP helyek veszik körbe, ami lehetővé teszi az exon kivágását Cre-rekombinázorok által. A megváltozott *Igfl* gén fehérje átiratai nem kötődnek az IGF receptorhoz. A hepatociták targetálásához adenovírusokat (AAV) vásároltunk a University of Pennsylvania Vector Core-tól (Philadelphia, PA). 2 hónapos korban kb. 1.3×10^{10} AAV8.TBG.PI.Cre.rBG (*Igfl* knock-out céljából) vagy AAV8.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH (kontrollként) vírus partikulum került beadásra *Igfl^{fl/fl}* egerekbe. A tiroxin-kötő globulin (TBG) promótere kizárólag a hepatocitákra korlátozza az expressziót. A kísérleteket három hónappal az *Igfl* knock-down után végeztük.

Keringő és szöveti IGF-1 szint meghatározása

Vénás vért vettünk mindkét csoportba tartozó állatok submandibularis vénáiból, a teljes vért 2500 x g-vel centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on, majd a szérumot leszívva azt -80 °C-on tároltuk. A szérum és homogenizált agykérgi szövetminták IGF-1 szintjét ELISA-val (R&D Systems, Minneapolis, MN) mértük a gyártó protokollja szerint (ng/mL pg/mg szövet).

A térbeli memória felmérése Y-maze-el

3 hónappal az *Igfl* knock-down után a térbeli memóriát Y maze-el mértük fel, a fent leírtaknak megfelelően.

Neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálata

A fent leírtaknak megfelelően az IGF-1 hiányos, valamint kontroll állatok neurovaszkuláris kapcsolását vizsgáltuk. A CBF válasz kiváltása után a bajusz-stimuláció által kiváltott hiperémiás választ megismételtük a következők jelenlétében (a drogokat topikálisan, a perfundált koponya ablakon keresztül alkalmazva): HET0016 (20-hidroxi-eikozatriénsav (20-HETE) termelődésének gátlója, 10^{-6} mol/l 30 percig, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) [66], MS-PPOH (EET-termelés gátlója, 20×10^{-6} mol/L 30 percig, Cayman Chemicals) [291], L-NAME (N ω -Nitro-L-arginin-metil-észter, nitrogén-monoxid-szintáz inhibitora, 10^{-4} mol/l 20

percig, Sigma Aldrich), apocinin (NADPH-oxidázok gátlója, 3×10^{-4} mol/l 30 percig, Cayman Chemicals), fluor-acetát-nátrium (a trikarbonsav ciklus gátlója túlnyomórészt gliasejtekben, 10^{-4} mol/L perc, Sigma Aldrich) [208, 292], indometacin (ciklooxygenáz inhibitor, 5×10^{-4} mol/L, Sigma Aldrich) [293], MPEP (6-Metil-2-(feniletinil)piridin-hidroklorid, I. csoport metabotrop glutamát receptorok (mGluR) 5. altípus antagonistája, 5×10^{-5} mol/L) [186] és az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor antagonistája D-AP5 (D-2-amino-5-foszfonovaleriánsav, 5×10^{-5} mol/l, Cayman Chemicals) [62]. Külön kísérletsorozatban (n=8) meghatároztuk az L-glutamát ($500 \mu\text{mol/L}$) topikális adása által kiváltott CBF válaszokat [57] MPEP (5×10^{-5} mol/L) és D-AP5 (5×10^{-5} mol/l) hiányában és jelenlétében [62]. Az acetilkolinra (ACh; 10^{-5} mol/L) adott CBF válaszokat is vizsgáltuk. A CBF válaszokat az alap véráramlás százalékos (%) változásaként fejeztük ki.

Spontán neurális aktivitás és kiváltott válasz vizsgálatok a primer szomatoszenzoros kéregben

A vizsgált állat csoportokban a fent leírtaknak megfelelően meghatároztuk az IGF-1 hiány hatását a szomatoszenzoros kéreg spontán aktivitására, valamint szomatoszenzoros stimulusk által kiváltott mező potenciál válaszaira. A bazális aktivitást a hullámamplitúdó frekvencia függvényében mutatott eloszlásaként elemeztük [294], a szomatoszenzoros kiváltott mező potenciál válaszok negatív amplitúdóját az excitatórikus posztszinaptikus potenciálnak (fEPSP) [283] tekintettük.

Bajusz-stimuláció által kiváltott extracelluláris glutamát mérése

Egy külön állatcsoportban vizsgáltuk az extracelluláris glutamát szint változásait a szomatoszenzoros kéregben kontralaterális bajusz-párna stimuláció hatására. A fent leírt módon elkészített koponya ablakot ACSF-fel perfundáltuk. A glutamát szenzor egy platina elektróda, amely glutamát-oxidázt tartalmazó bioréteggel van bevonva, védett az aszkorbáttal, uráttal, dopaminnal és 5-hidroxi-triptaminnal való interferencia ellen. A kísérletek előtt a munkaelektrodát (Sarissa GLU Biosensor, $25 \mu\text{m}$ -es csúcs, Sarissa Biomedical, Coventry, UK) a gyártói utasítások szerint *in vitro* kalibráltuk, majd a bregmától $1,5 \text{ mm}$ -re caudálisan és a középvonaltól 3 mm -rel laterálisan körülbelül $500 \mu\text{m}$ mélyen az agyszövetbe helyeztük. Kontrollként glutamát null szenzort (a bioszenzorhoz szükséges enzimek nélkül) használtunk. A referenciaelektrodát (Ag/AgCl) máshol az agyszövetbe, a segédelektrodát (Ag/AgCl) pedig a fejbőr és a koponya közé helyeztük. A potenciált $0,5 \text{ V}$ -ra állítottuk be az Ag/AgCl-vel szemben. Az állandó potenciál amperometriához egy 3 elektródás potenciosztátot (Quadstat) használtunk eDAQ adatgyűjtő rendszerrel (eDAQ Pty Ltd., USA, CO). Az elektródák

behelyezése után kb. 2-3 percet vártunk, amíg stabil alapvonal alakult ki. Ezután 1 percig stimuláltuk a bajusz-párnát 5 Hz-en, három egymást követő sorozatban, 5-10 perces időközökkel elválasztva. A választ nA-ban rögzítettük, és a kalibrációs görbe segítségével μM glutamatra konvertáltuk.

Astrocyták izolálása

Az astrocytákat a specifikusan rajtuk található glutamát transporter, az extracelluláris epitóp *Glast* segítségével immun-purifikáltuk a kísérleti és kontroll állatok corticális szöveteiből. A kéreg darabokat jéghideg HBSS-ben izoláltuk, L15 mediában enzimatikusan emésztettük 0,05% tripszinnel 20 percig 37 °C-on, 0,7 μm -es sejt-szűrőn filtráltuk. A fennmaradó sejteket üleptítettük, 100 μl 0,5% BSA-t tartalmazó HBSS-ben újraszuszpendáltuk, és anti-Glast-PE-vel (1:10, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) inkubáltuk 10 percig 4 °C-on. Ezután anti-PE mikrobead-eket (Miltenyi Biotech) adtunk hozzá, és további 10 percig 4 °C-on inkubáltuk. A sejteket üleptítettük és háromszor mostuk 0,5% BSA-t tartalmazó PBS-sel a mágneses purifikáció előtt.

Kvantitatív real-time RT-PCR

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően kvantitatív valós idejű RT-PCR technikát alkalmaztunk a nitrogén-monoxid szintáz, NADPH oxidázok, NMDA receptorok, metabotrop glutamát receptorok, ciklooxygenázok, epoxigenázok és ω -hidroxilázok expressziójának vizsgálatához kérgi mintákban és izolált asztrocitákban IGF1- hiányos és kontroll állatokban.

Arachidonsav metabolitok meghatározása agyszeletekből folyadék kromatográfia-tömeg spektrometria (LC/MS/MS) használatával

A kísérleteket részben Dr. Ginger Milne laboratóriumában végezték (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN USA). Annak meghatározására, hogy az IGF-1 hiány miként befolyásolja az eikozanoid gliotranszmitterek szintézisét, 400 μm vastagságú horizontális hippocampális agyszeleteket készítettünk a már leírt módszernek megfelelően. A szeleteket saját készítésű kamrában (Dr. Deák Ferenc) glutamát hozzáadásával (3×10^{-4} mol/L) stimuláltuk, majd lefagyasztottuk további elemzés céljából. Ezt követően a mintákat jéghideg foszfát pufferben (pH 6,8) homogenizáltuk. 1000 egység *E. coli* β -glükuronidázt adtunk a szövet kivonathoz, hogy felszabadítsuk a 20-HETE-t a glükuron-savval való konjugációból. 37 °C-on 2 órás inkubálás után az oldat pH-ját ecetsav hozzáadásával 3-ra állítottuk be. [$^2\text{H}_4$]-20-HETE-t (10 ng) adtunk a mintához, majd savas $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) keverékkel extraháltuk,

és szilícium-dioxid szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk. A különböző mintákat jéghideg 0,15 M KCl-ba helyeztük. Homogenizálás után belső standardként szintetikus [$^2\text{H}_{11}$]-jelölt 14,15-DHET-et (5 ng) adtunk a mintákhoz. Az EET-eket és a DHET-eket a szövethomogenizátumból savas $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -val (2:1) extraháltuk, és szilícium-dioxid szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk, elválasztva az EET-eket és a DHET-eket. A méréseket LC/MS/MS módszerrel végeztük, Acquity BEH C18 oszlopok ($1,0 \times 100$ mm; $1,7 \mu\text{m}$) használatával, amelyek TSQ-Quantum Vantage spektrométerhez (ThermoScientific) voltak csatlakoztatva, lineáris oldószergradienssel. A 20-HETE analíziséhez a 20-HETE fragmentációját használtuk m/z (mass to charge) 319-nél és a [$^2\text{H}_4$]-20-HETE belső standardot m/z 325-nél. A 20-HETE csúcs területének és a deuterált 20-HETE területének arányát használtuk a kvantifikációhoz. Az EET-analízishez az EET-eket a megfelelő DHET-ekké alakítottuk át ecetsavas kezeléssel. Ezután a DHET fragmentációját használtuk m/z 337-nél és a [$^2\text{H}_{11}$]-DHET belső standardot m/z 448-nál. Szelektív ion analízist végeztünk m/z 206-nál 14,15-DHET esetén. Ugyanezeket az ionokat használtuk a deuterált belső standardokhoz is. A számszerűsítést a DHET csúcsok területének és a megfelelő deuterált DHET csúcsok területének arányával végeztük [295, 296].

Agyi oxidatív stressz meghatározása

Az IGF-1 hiány agyi oxidatív stresszre gyakorolt hatásának jellemzésére a korábban részletezett módon 3-nitrotirozin (3-NT) meghatározást végeztünk kérgi homogenizátumban,

Statisztikai analízis

Az adatokat nem-páros t próbával, valamint két-tényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük, amit Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás követett. A 0,05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, az adatokat átlag \pm S.E.M. formában adjuk meg.

VI.8. Neurovaszkuláris szét-kapcsolás idős emberekben: az inzulinszerű növekedési faktor szerepe

Beteg bevonás

A vizsgálatokat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá. A résztvevőket prospektív módon, önkéntes alapon vontuk be a vizsgálatba. A bevonási kritériumok a következők voltak: fiatal csoport 18-40, valamint idős csoport 60 év feletti életkor minden résztvevőtől írásos beleegyezéssel. A kizárási kritériumok a következők voltak: korábbi vagy folyamatban lévő neurológiai betegség; minden olyan állapot, amely befolyásolhatja az IGF-1 szintjét (neoplázia, nefrektómia, vesebetegség, endokrin rendellenességek, terhesség, nem kontrollált cukorbetegség, éhezés, kortikoszteroid-terápia; temporálisan akusztikus ablak hiánya (Doppler szonográfia nem végezhető). Összesen 63 résztvevőt vontunk be a vizsgálatba: 31 fiatal (átlagéletkor: 28,4±4,2 év, 11 nő, 20 férfi) és 32 idős felnőtt (átlagéletkor: 67,9±4,1 év, 18 nő, 14 férfi).

Szérum IGF-1 szint meghatározása

A résztvevőktől vérmintát vettünk a neurovaszkuláris kapcsolás vizsgálata előtt, centrifugáltuk (3500 fordulat/perc, 15 perc), a szérumot leszívtuk. Az IGF-1 szintjét enzimm-amplifikált kemilumineszcens immunoesszé (CLIA) segítségével határoztuk, IGF-1 kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA, katalógusszám: L2KGF2) használatával Siemens IMMULITE 2000 platformon (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország).

Neurovaszkuláris kapcsolás (NVC) mérése emberben

Az NVC válaszok vizsgálatához transcraniális Doppler ultrahangot használtunk (DWL Multi-Dop® T digital, Singen, Németország) 2 MHz-es transzducerekkel. A transzducereket bilaterálisan rögzítettük a temporális akusztikus ablakoknak megfelelően, és 45-60 mm mélységben regisztráltuk a középső agyi artériák (MCA) áramlási sebességét folyamatos non-invazív vérnyomásmérés (CNAP Monitor 500 HD, CNSystems, Graz, Ausztria) és kilégzett CO₂ mérés (kapnográfia, Promed, Kwun Tong, Kowloon, Hong Kong) mellett. Az áramlásmérések nyers adatait ICM+® szoftverrel (Cambridge, Anglia) elemeztük. A reaktív hyperemiás válaszokat a 60 másodperces "trail making" teszt végrehajtása során vettük fel (Dr. Ronney Panerai nyomán). A "trail making" teszt egy széles körben elérhető neuropszichológiai teszt, amelyben a résztvevőnek 25 bekarikázott számot kell numerikus sorrendben tollal összekapcsolnia. A számokat félig véletlenszerűen helyezük el a tesztben, hogy elkerüljük a

vonalak keresztezését. Az értékeléshez mind a teszt elvégzéséhez szükséges időt, mind a hibákat mérjük [297]. A neuronális aktivitás által megnövelt agyi véráramlás az MCA áramlási sebességének (és átáramlott vértérfogatnak) a növekedéseként jelentkezik az MCA distalis keringési területeinek rezisztencia csökkenése következtében. A vaszkuláris reaktivitás meghatározására légzésvisszatartási tesztet végeztünk (a CO₂ által indukált vazodilatáció és következményes hiperemia megítélésére) [298]. Az agyi véráramlás és az NVC válaszok értékeléséhez a következő paramétereket folyamatos regisztrációját végeztük: artériás vérnyomás (ABP), átlagos artériás nyomás (MAP), átlagos agyi véráramlási sebesség (CBFv, mindkét oldalon az MCA-k közepén cm/s-ben mérve). Cerebrovaszkuláris konduktancia indexet (CVCi) számítottunk a jobb és bal MCA adataiból, a CBFv és a MAP hányadosaként (cm/s/Hgmm) [299]. A neurovaszkuláris tesztek során a non-invazív folyamatos vérnyomásmérővel mért átlagos vérnyomás nem különbözött szignifikánsan a korcsoportok között (90±15 vs. 107±16 Hgmm fiatal és időseknél), a kilégzett CO₂ szintek a fiziológias tartományban (35-45 Hgmm) voltak.

Áramlás vizsgálat MRI-vel

Az MRI méréseket 3T MRI szkenneren (MAGNETOM PrismaFit, Siemens Healthcare, Erlangen, Németország) végeztük, 20 csatornás fej/nyak tekercsel. Az áramlást mind a bal, mind a jobb középső agyi artériák (MCA) M1 szegmensében mértük parasagittális kétdimenziós egyszeteles fáziskontraszt (PC) szekvenciával perifériás impulzuskapuzás mellett, a következő paraméterekkel: TR/TE=89.22/9.03 ms; billenési szög=15 fok; szeletvastagság=4 mm; FOV=140x140 mm²; mátrix mérete=256x256 interpolálva 512x512-re; vevő sávszélessége=130 Hz/pixel; átlagok=3; fázisok száma=25; sebességkódolás (VENC)=100 cm/s átmenő síkírányban. A képalkotó síkot az erek hossz tengelyére merőlegesen helyeztük natív 3D time-of-flight MR angiográfiával (TOF-MRA) a következő paraméterekkel: TR/TE=22/3.86 ms; billenési szög=18 fok; szeletvastagság=0,7 mm; FOV=167x222 mm²; mátrix mérete=202x384; vevő sávszélessége=178 Hz/pixel; 4 átfedő (27,08%) lap; összesen 153 axiális szelet (48 szelet/lap). A PC MRI adatok áramlási elemzését Argus szoftverrel (Leonardo munkaállomás; Siemens Healthcare, Erlangen, Németország) végeztük. A képek Argusba való betöltése után az MCA érkontúrját manuálisan körvonalaztuk az első szív ciklus alatt, ami utána automatikusan továbbítódott a többi szív ciklusba. Az ér határai közelében bekövetkező fáziscsúszás elkerülése érdekében a sebességtartományt ± 100 cm/s és -50/+150 cm/s között állítottuk be. A háttérkorrekció alkalmazása után a szoftver automatikusan kiszámította az átlagos áramlást (ml/s) és az átlagos MCA területet (cm²).

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést t-próbával végeztük. A kétváltozós Pearson-korrelációt a folytonos változópárok közötti lineáris kapcsolatok erősségének és irányának mérésére használtuk. A statisztikai tesztek elvégzéséhez GraphPad Pro-t és SPSS-t használtunk. A 0.05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

VII. A doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk

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

VIII. Referenciák

1. Lassen, N.A., *Cerebral blood flow and oxygen consumption in man*. Physiological reviews, 1959. **39**(2): p. 183-238.
2. Lassen, N.A., *Autoregulation of Cerebral Blood Flow*. Circ Res, 1964. **15**: p. SUPPL:201-4.
3. Lassen, N.A., *Control of cerebral circulation in health and disease*. Circulation research, 1974. **34**(6): p. 749-60.
4. Brassard, P., et al., *Losing the dogmatic view of cerebral autoregulation*. Physiol Rep, 2021. **9**(15): p. e14982.
5. Iadecola, C., *The pathobiology of vascular dementia*. Neuron, 2013. **80**(4): p. 844-66.
6. Tarantini, S., et al., *Pharmacologically-induced neurovascular uncoupling is associated with cognitive impairment in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015.
7. Iadecola, C., *The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(3): p. 287-96.
8. 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.
9. De Silva, T.M. and F.M. Faraci, *Microvascular Dysfunction and Cognitive Impairment*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(2): p. 241-58.
10. 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.
11. 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.
12. Mellander, S., *Functional aspects of myogenic vascular control*. J Hypertens Suppl, 1989. **7**(4): p. S21-30; discussion S31.
13. 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.
14. Vinall, P.E. and F.A. Simeone, *Cerebral autoregulation: an in vitro study*. Stroke, 1981. **12**(5): p. 640-2.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Toth, P., et al., *Age-related autoregulatory dysfunction and cerebromicrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(11): p. 1732-42.
20. 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.
21. Forbes, H.S., *Regulation of the cerebral vessels; new aspects*. A. M. A. archives of neurology and psychiatry, 1958. **80**(6): p. 689-95.
22. McHedlishvili, G., *Physiological mechanisms controlling cerebral blood flow*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1980. **11**(3): p. 240-8.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. 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.
27. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure*. Circulation research, 1990. **66**(1): p. 8-17.
28. Harper, S.L., H.G. Bohlen, and M.J. Rubin, *Arterial and microvascular contributions to cerebral cortical autoregulation in rats*. Am J Physiol, 1984. **246**(1 Pt 2): p. H17-24.
29. 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.
30. Stromberg, D.D. and J.R. Fox, *Pressures in the pial arterial microcirculation of the cat during changes in systemic arterial blood pressure*. Circulation research, 1972. **31**(2): p. 229-39.
31. Smeda, J.S., B.N. VanVliet, and S.R. King, *Stroke-prone spontaneously hypertensive rats lose their ability to auto-regulate cerebral blood flow prior to stroke*. J Hypertens, 1999. **17**(12 Pt 1): p. 1697-705.
32. Cipolla, M.J., in *The Cerebral Circulation*. 2009: San Rafael (CA).
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Faraco, G. and C. Iadecola, *Hypertension: a harbinger of stroke and dementia*. Hypertension, 2013. **62**(5): p. 810-7.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Welsh, D.G., et al., *Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 248-50.
42. 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.
43. 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.
44. Toth, P., et al., *Role of 20-HETE, TRPC channels, and 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. **305**(12): p. H1698-708.
45. Dunn, K.M., et al., *Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(6): p. H2455-65.
46. 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.
47. Reading, S.A. and J.E. Brayden, *Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation*. Stroke, 2007. **38**(8): p. 2322-8.

48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Schubert, R. and M.J. Mulvany, *The myogenic response: established facts and attractive hypotheses*. Clinical science, 1999. **96(4)**: p. 313-26.
54. 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.
55. 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.
56. Attwell, D., et al., *Glial and neuronal control of brain blood flow*. Nature, 2010. **468(7321)**: p. 232-43.
57. Hall, C.N., et al., *Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease*. Nature, 2014. **508(7494)**: p. 55-60.
58. 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.
59. 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.
60. Cauli, B. and E. Hamel, *Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling*. Front Neuroenergetics, 2010. **2**: p. 9.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Cheng, J., et al., *20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid mediates endothelial dysfunction via IκB kinase-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2010. **332(1)**: p. 57-65.
66. Liu, X., et al., *Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295(2)**: p. H619-31.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.

72. Filosa, J.A., et al., *Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain*. Nat Neurosci, 2006. **9**(11): p. 1397-1403.
73. 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.
74. Paulson, O.B., et al., *Cerebral blood flow response to functional activation*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(1): p. 2-14.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Fabiani, M., et al., *Neurovascular coupling in normal aging: A combined optical, ERP and fMRI study*. Neuroimage, 2013.
79. 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.
80. Iadecola, C., L. Park, and C. Capone, *Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension*. Stroke, 2009. **40**(3 Suppl): p. S40-4.
81. 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.
82. 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.
83. Reitz, C., et al., *Hypertension and the risk of mild cognitive impairment*. Archives of neurology, 2007. **64**(12): p. 1734-40.
84. Kuller, L.H., et al., *Determinants of vascular dementia in the Cardiovascular Health Cognition Study*. Neurology, 2005. **64**(9): p. 1548-52.
85. Hachinski, V., et al., *National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2006. **37**(9): p. 2220-41.
86. Paulson, O.B., S. Strandgaard, and L. Edvinsson, *Cerebral autoregulation*. Cerebrovascular and brain metabolism reviews, 1990. **2**(2): p. 161-92.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. Kontos, H.A., et al., *Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation*. The American journal of physiology, 1978. **234**(5): p. H582-91.
91. Smeda, J.S., *Cerebral vascular changes associated with hemorrhagic stroke in hypertension*. Can J Physiol Pharmacol, 1992. **70**(4): p. 552-64.
92. Bell, R.D., et al., *Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging*. Neuron, 2010. **68**(3): p. 409-27.
93. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. **57**(2): p. 178-201.
94. 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.
95. Roman, R.J., *P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 131-85.

96. Muller, D.N., et al., *Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation*. *Biochem J*, 2007. **403**(1): p. 109-18.
97. Inoue, R., et al., *Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways*. *Circ Res*, 2009. **104**(12): p. 1399-409.
98. Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic, *Central nervous system pericytes in health and disease*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(11): p. 1398-405.
99. 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.
100. 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.
101. Kaneko, Y.S., et al., *Microglial activation in neuroinflammation: implications for the etiology of neurodegeneration*. *Neurodegener Dis*, 2012. **10**(1-4): p. 100-3.
102. Roozenbeek, 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.
103. 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.
104. Tagliaferri, F., et al., *A systematic review of brain injury epidemiology in Europe*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2006. **148**(3): p. 255-68; discussion 268.
105. Sahuquillo, J., M.A. Poca, and S. Amoros, *Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury*. *Curr Pharm Des*, 2001. **7**(15): p. 1475-503.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Cold, G.E. and F.T. Jensen, *Cerebral autoregulation in unconscious patients with brain injury*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1978. **22**(3): p. 270-80.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. Czosnyka, M., et al., *Cerebral autoregulation following head injury*. *J Neurosurg*, 2001. **95**(5): p. 756-63.
114. Czosnyka, M., et al., *Monitoring of cerebral autoregulation in head-injured patients*. *Stroke*, 1996. **27**(10): p. 1829-34.
115. Junger, E.C., et al., *Cerebral autoregulation following minor head injury*. *J Neurosurg*, 1997. **86**(3): p. 425-32.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. Golding, E.M., et al., *Temporal effect of severe controlled cortical impact injury in the rat on the myogenic response of the middle cerebral artery*. *J Neurotrauma*, 1998. **15**(11): p. 973-84.

120. Mathew, B.P., et al., *Traumatic brain injury reduces myogenic responses in pressurized rodent middle cerebral arteries*. J Neurotrauma, 1999. **16**(12): p. 1177-86.
121. Villalba, N., et al., *Traumatic brain injury disrupts cerebrovascular tone through endothelial inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide gain of function*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(6): p. e001474.
122. 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.
123. 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.
124. Kontos, H.A. and E.P. Wei, *Superoxide production in experimental brain injury*. J Neurosurg, 1986. **64**(5): p. 803-7.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Randhawa, P.K. and A.S. Jaggi, *TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(6): p. 54.
130. 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.
131. Iida, Y. and Z.S. Katusic, *Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide*. Stroke, 2000. **31**(9): p. 2224-30.
132. Price, R.S. and S.E. Kasner, *Hypertension and hypertensive encephalopathy*. Handb Clin Neurol, 2014. **119**: p. 161-7.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Manucha, W., *Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity*. Clin Investig Arterioscler, 2016.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. 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.

143. 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.
144. Lifshitz, J., et al., *Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury*. Mitochondrion, 2004. **4**(5-6): p. 705-13.
145. 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.
146. 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.
147. Guikema, B.J., et al., *Catalase potentiates interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(5): p. 597-605.
148. Boveris, A. and E. Cadenas, *Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 245-50.
149. Greensmith, D.J., D.A. Eisner, and M. Nirmalan, *The effects of hydrogen peroxide on intracellular calcium handling and contractility in the rat ventricular myocyte*. Cell Calcium, 2010. **48**(6): p. 341-51.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. 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.
156. Cooney, S.J., S.L. Bermudez-Sabogal, and K.R. Byrnes, *Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isoforms after brain injury*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 155.
157. Fehily, B. and M. Fitzgerald, *Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage*. Cell Transplant, 2017. **26**(7): p. 1131-1155.
158. Pinto, C.C., et al., *Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy*. Free Radic Res, 2007. **41**(10): p. 1151-8.
159. Springo, Z., et al., *Aging Exacerbates Pressure-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Mouse Cerebral Arteries*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015.
160. 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).
161. Uryu, K., et al., *Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis*. J Neurosci, 2002. **22**(2): p. 446-54.
162. Conte, V., et al., *Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury*. J Neurochem, 2004. **90**(3): p. 758-64.
163. 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.
164. 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.

165. 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.
166. Dikalov, S.I. and Z. Ungvari, *Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(10): p. H1417-27.
167. Touyz, R.M. and A.C. Montezano, *Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase*. Circ Res, 2012. **110**(9): p. 1159-61.
168. Dai, D.F., et al., *Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(1): p. 73-82.
169. 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.
170. Ma, M.W., et al., *NADPH oxidases in traumatic brain injury - Promising therapeutic targets?* Redox Biol, 2018. **16**: p. 285-293.
171. 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.
172. Szarka, N., et al., *Traumatic Brain Injury Impairs Myogenic Constriction of Cerebral Arteries: Role of Mitochondria-Derived H₂O₂ and TRPV4-Dependent Activation of BKCa Channels*. J Neurotrauma, 2018.
173. Chalupsky, K. and H. Cai, *Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 9056-61.
174. 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.
175. 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.
176. Krishnamoorthy, V., et al., *Hypertension After Severe Traumatic Brain Injury: Friend or Foe?* J Neurosurg Anesthesiol, 2016.
177. Sellmann, T., et al., *The impact of arterial hypertension on polytrauma and traumatic brain injury*. Dtsch Arztebl Int, 2012. **109**(49): p. 849-56.
178. 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.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. Zlokovic, B.V., *Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(12): p. 723-38.
183. 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.
184. 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.
185. Takano, T., et al., *Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 260-7.
186. 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.
187. 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.
188. Kazama, K., et al., *Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals.* Circ Res, 2004. **95**(10): p. 1019-26.
 189. 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.
 190. Heinzl, S., et al., *A neurodegenerative vascular burden index and the impact on cognition.* Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 161.
 191. 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.
 192. 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.
 193. 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.
 194. 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.
 195. Sorond, F.A., et al., *Neurovascular coupling is impaired in slow walkers: the MOBILIZE Boston Study.* Ann Neurol, 2011. **70**(2): p. 213-20.
 196. Sorond, F.A., et al., *Neurovascular coupling, cerebral white matter integrity, and response to cocoa in older people.* Neurology, 2013.
 197. 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.
 198. Ungvari, Z.I., et al., *Increased mitochondrial H2O2 production promotes endothelial NF-kB activation in aged rat arteries.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H37-47.
 199. 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.
 200. Zhang, H., et al., *Resveratrol improves endothelial function: role of TNF{alpha} and vascular oxidative stress.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(8): p. 1164-71.
 201. 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.
 202. 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.
 203. 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.
 204. 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.
 205. 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.
 206. 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.
 207. Oomen, C.A., et al., *Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice.* Front Aging Neurosci, 2009. **1**: p. 4.
 208. Lecrux, C., et al., *Pyramidal cells and cytochrome P450 epoxygenase products in the neurovascular coupling response to basal forebrain cholinergic input.* J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(5): p. 896-906.
 209. 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.
 210. 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.

211. 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.
212. Baur, J.A., et al., *Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan?* Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(6): p. 443-61.
213. 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.
214. 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.
215. 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.
216. Csiszar, A., et al., *Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1159-66.
217. Csiszar, A., et al., *Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1159-66.
218. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiological reviews, 2007. **87**(1): p. 315-424.
219. Dai, D.F., P.S. Rabinovitch, and Z. Ungvari, *Mitochondria and cardiovascular aging*. Circ Res, 2012. **110**(8): p. 1109-24.
220. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(5): p. H1876-81.
221. Sorond, F.A., et al., *Neurovascular coupling, cerebral white matter integrity, and response to cocoa in older people*. Neurology, 2013. **81**(10): p. 904-9.
222. 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, 2014. **306**(3): p. H299-308.
223. Sonntag, W.E., et al., *Insulin-like growth factor-1 in CNS and cerebrovascular aging*. Front Aging Neurosci, 2013. **5**: p. 27.
224. 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.
225. 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.
226. Damke, H., H. Bouterfa, and T. Bräulke, *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.
227. 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.
228. 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.
229. Petzold, G.C. and V.N. Murthy, *Role of astrocytes in neurovascular coupling*. Neuron, 2011. **71**(5): p. 782-97.
230. 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.
231. Trejo, J.L., et al., *Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(12): p. 1118-28.
232. 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.
233. 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.

234. 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.
235. 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.
236. Csiszar, A., et al., *Overexpression of catalase targeted to mitochondria improves neurovascular coupling responses in aged mice*. Geroscience, 2019. **41**(5): p. 609-617.
237. 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.
238. 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.
239. Ameri, P., et al., *Vitamin D modulates the association of circulating insulin-like growth factor-I with carotid artery intima-media thickness*. Atherosclerosis, 2014. **236**(2): p. 418-25.
240. Sherlala, R.A., et al., *Relationship between Serum IGF-1 and BMI differs by Age*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2020.
241. Toth, P., et al., *IGF-1 deficiency impairs neurovascular coupling in mice: implications for cerebrovascular aging*. Aging Cell, 2015. **14**(6): p. 1034-44.
242. Tarantini, S., et al., *IGF1R signaling regulates astrocyte-mediated neurovascular coupling in mice: implications for brain aging*. Geroscience, 2021. **43**(2): p. 901-911.
243. 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.
244. Lipecz, A., et al., *Age-related impairment of neurovascular coupling responses: a dynamic vessel analysis (DVA)-based approach to measure decreased flicker light stimulus-induced retinal arteriolar dilation in healthy older adults*. Geroscience, 2019.
245. Yabluchanskiy, A., et al., *Age-related alterations in the cerebrovasculature affect neurovascular coupling and BOLD fMRI responses: Insights from animal models of aging*. Psychophysiology, 2021. **58**(7): p. e13718.
246. West, K.L., et al., *BOLD hemodynamic response function changes significantly with healthy aging*. Neuroimage, 2018. **188**: p. 198-207.
247. Csipo, T., et al., *Assessment of age-related decline of neurovascular coupling responses by functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) in humans*. Geroscience, 2019. **41**(5): p. 495-509.
248. Tarantini, S., et al., *Pharmacologically induced impairment of neurovascular coupling responses alters gait coordination in mice*. Geroscience, 2017. **39**(5-6): p. 601-614.
249. 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.
250. 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.
251. Ungvari, Z., et al., *Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(9): p. 555-565.
252. 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.
253. 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.
254. Pan, W. and A.J. Kastin, *Interactions of IGF-1 with the blood-brain barrier in vivo and in situ*. Neuroendocrinology, 2000. **72**(3): p. 171-8.
255. Csipo, T., et al., *Increased cognitive workload evokes greater neurovascular coupling responses in healthy young adults*. PLoS One, 2021. **16**(5): p. e0250043.

256. 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.
257. Sorond, F.A., et al., *Cerebral blood flow regulation during cognitive tasks: effects of healthy aging*. Cortex, 2008. **44**(2): p. 179-84.
258. 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.
259. Tsai, J.Y., et al., *Using SMAA-GFP mice to study pericyte coverage of retinal vessels*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**: p. 12.
260. Wakisaka, Y., et al., *Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2010. **30**(1): p. 56-69.
261. Carrie, I., et al., *Age-induced cognitive alterations in OF1 mice*. Physiol Behav, 1999. **66**(4): p. 651-6.
262. Niwa, K., et al., *Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(1): p. H315-23.
263. Ayata, C., et al., *Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2004. **24**(7): p. 744-55.
264. Toth, P., et al., *Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2011. **31**(10): p. 2096-105.
265. Ungvari, Z., et al., *Fluoxetine dilates isolated small cerebral arteries of rats and attenuates constrictions to serotonin, norepinephrine, and a voltage-dependent Ca(2+) channel opener*. Stroke, 1999. **30**(9): p. 1949-54.
266. Toth, P., et al., *Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(10): p. 2096-105.
267. Koller, A. and P. Toth, *Contribution of Flow-Dependent Vasomotor Mechanisms to the Autoregulation of Cerebral Blood Flow*. Journal of vascular research, 2012. **49**(5): p. 375-389.
268. Miyata, N., et al., *HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme*. British journal of pharmacology, 2001. **133**(3): p. 325-9.
269. Bailey-Downs, L.C., et al., *Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: A novel model of vascular aging*. J Gerontol Biol Med Sci, 2012. **67**(4): p. 313-29.
270. Kaya, M. and B. Ahishali, *Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase*. Methods Mol Biol, 2011. **763**: p. 369-82.
271. Kaya, M. and B. Ahishali, *Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase*. Methods in molecular biology, 2011. **763**: p. 369-82.
272. Warrington, J.P., et al., *Cerebral microvascular rarefaction induced by whole brain radiation is reversible by systemic hypoxia in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(3): p. H736-44.
273. Marmarou, A., et al., *A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics*. J Neurosurg, 1994. **80**(2): p. 291-300.
274. Matoba, T., et al., *Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1521-30.
275. Zhao, K., et al., *Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34682-90.
276. Brand-Schieber, E., J.F. Falck, and M. Schwartzman, *Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo*. J Physiol Pharmacol, 2000. **51**(4 Pt 1): p. 655-72.
277. Antunes, M. and G. Biala, *The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications*. Cogn Process, 2012. **13**(2): p. 93-110.
278. MacLaren, D.A., et al., *Deficits in motor performance after pedunculopontine lesions in rats - impairment depends on demands of task*. Eur J Neurosci, 2014.

279. Bouet, V., et al., *The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice*. Nat Protoc, 2009. **4**(10): p. 1560-4.
280. Hamers, F.P., G.C. Koopmans, and E.A. Joosten, *CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2006. **23**(3-4): p. 537-48.
281. Nehlig, A., E. Wittendorp-Rechenmann, and C.D. Lam, *Selective uptake of [14C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular 14C-trajectography combined with immunohistochemistry*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(9): p. 1004-14.
282. Frayling, C., R. Britton, and N. Dale, *ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 9): p. 2275-86.
283. Lind, B.L., et al., *Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(48): p. E4678-87.
284. Leithner, C., et al., *Determination of the brain-blood partition coefficient for water in mice using MRI*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(11): p. 1821-4.
285. Herscovitch, P. and M.E. Raichle, *What is the correct value for the brain-blood partition coefficient for water?* J Cereb Blood Flow Metab, 1985. **5**(1): p. 65-9.
286. Oka, H., et al., *A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice*. J Neurosci Methods, 1999. **93**(1): p. 61-7.
287. Ungvari, Z., et al., *Aging-Induced Dysregulation of Dicer1-Dependent MicroRNA Expression Impairs Angiogenic Capacity of Rat Cerebromicrovascular Endothelial Cells*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012.
288. Tucsek, Z., et al., *Aging Exacerbates Microvascular Endothelial Damage Induced by Circulating Factors Present in the Serum of Septic Patients*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012.
289. Csiszar, A., et al., *Testing the oxidative stress hypothesis of aging in primate fibroblasts: is there a correlation between species longevity and cellular ROS production?* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(8): p. 841-52.
290. Ungvari, Z., et al., *Free Radical Production, Antioxidant Capacity, and Oxidative Stress Response Signatures in Fibroblasts From Lewis Dwarf Rats: Effects of Life Span-Extending Peripubertal GH Treatment*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011.
291. Shi, Y., et al., *Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors, and metabotropic glutamate receptors in neurovascular coupling in rat whisker barrel cortex*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(1): p. 111-25.
292. Fonnum, F., A. Johnsen, and B. Hassel, *Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism*. Glia, 1997. **21**(1): p. 106-13.
293. Kitaura, H., et al., *Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex*. Neurosci Res, 2007. **59**(2): p. 160-71.
294. Park, L., et al., *Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 1073-8.
295. Nakagawa, K., et al., *Salt-sensitive hypertension is associated with dysfunctional Cyp4a10 gene and kidney epithelial sodium channel*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1696-702.
296. Capdevila, J.H., et al., *Cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase: stereochemical characterization of epoxyeicosatrienoic acids*. Methods Enzymol, 1991. **206**: p. 441-53.
297. Bowie, C.R. and P.D. Harvey, *Administration and interpretation of the Trail Making Test*. Nature Protocols, 2006. **1**(5): p. 2277-2281.
298. Alwatban, M., et al., *The Breath-Hold Acceleration Index: A New Method to Evaluate Cerebrovascular Reactivity using Transcranial Doppler*. J Neuroimaging, 2018. **28**(4): p. 429-435.
299. Jeong, S.M., et al., *Lack of correlation between cerebral vasomotor reactivity and dynamic cerebral autoregulation during stepwise increases in inspired CO₂ concentration*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(12): p. 1434-41.