

CEREBROVASKULÁRIS DISZFUNKCIÓ TRAUMÁS AGYKÁROSODÁST KÖVETŐEN

Ph.D Tézisfüzet

Dr. Szarka Nikolett

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola

Semmelweis Egyetem



Témavezetők: Dr. Tóth Péter, Ph.D.

Dr. Koller Ákos, MTA doktora, egyetemi tanár

Reviewerek: Dr. Bari Ferenc, MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Bereczki Dániel, MTA doktrora, egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság Elnöke: Dr. Dörnyei Gabriella, Ph.D.

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Nádasy György, Ph.D.

Dr. Garami András, Ph.D.

Budapest

2020

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés.....	1
2. Hipotézisek.....	3
3. Célkitűzés.....	3
4. Módszerek.....	4
5. Eredmények.....	5
6. Megbeszélés.....	8
7. Összefoglalás.....	10
8. A szerző publikációi.....	10
9. Köszönetnyilvánítás.....	12
10. Irodalomjegyzék.....	12

1. Bevezetés

A traumás agykárosodás (TBI – Traumatic Brain Injury) világszerte a vezető halálokok között szerepel.¹ Magas mortalitása mellett (35-40%) a túlélőkben fellépő krónikus viselkedésbeli és kognitív-zavarok nem csak a betegeknek és családjaiknak, hanem az egészségügyi ellátásnak is hatalmas terhet jelentenek.² Évente 1.7 millió ember szenved traumás agykárosodást az Egyesült Államokban^{2,3} és kb. 2.5 millió beteg az Európai Unióban³. A traumás agykárosodás a következményes tudatzavar alapján lehet enyhe (a Glasgow Coma Skála (GCS) szerint 14-15,) közepes (GCS 9-12) és súlyos (GCS 3-8)⁴. A mechanikai erő behatására bekövetkező elsődleges sérülést követően az ún. másodlagos agykárosodást^{5,6} előidéző patofiziológiai folyamatok indulnak el, amelyek szerepet játszanak a következményes kognitív⁷ és pszichés zavarok kialakulásában. Fontos kiemelni, hogy a másodlagos agykárosodás folyamatai és ezáltal azok következményei potenciálisan megelőzhetők. A másodlagos agykárosodás folyamataiban az agyi vérkeringés szabályozásának trauma kapcsán kialakuló zavara központi szerepet játszik.

Az agyi véráramlásnak a szisztémás vérnyomás változásaitól függetlenül állandónak kell lennie, hogy a zárt koponya térben elhelyezkedő, energiaraktárakkal nem rendelkező agyszövet stabil vérellátása biztosított legyen. Ezt a feladatot az agyi véráramlás autoregulációja látja el, aminek egyik központi mechanizmusa az agyi erek nyomás-indukálta ún. myogén válasza. A szisztémás nyomás csökkenésekor vasodilatációval, annak növekedésekor vasokonstriktióval a myogén válasz a nyomásváltozáshoz illesztett cerebrovaszkuláris rezisztencia-változással hozzávetőlegesen állandó véráramlást biztosít. A traumás agykárosodás központi jelentőségű cerebrovaszkuláris következménye az agyi autoreguláció és a cerebrovaszkuláris myogén válasz mechanizmusainak zavara. Ennek köszönhetően az agyi véráramlás a szisztémás vérnyomással párhuzamosan változik, attól nem független, vagyis a szisztémás nyomás csökkenésekor perfúziós deficit, annak növekedésekor cerebrális hyperaemia és következményes koponyaüri nyomás- és térfogatterhelés alakul ki. A TBI-okozta autoregulációs/myogén zavar mechanizmusa azonban nem ismert.

A traumás agykárosodást követően kialakuló autoregulációs zavar a fent említett mechanizmusokon (volumen és nyomás terhelés az agyi mikrocirkulációban) keresztül feltehetőleg a vér-agy gát (angol rövidítésének megfelelően BBB) zavarát idézi elő. A BBB működés károsodása központi szerepet játszik a betegség kimenetelét meghatározó másodlagos agykárosodás kialakulásában.^{5,6} BBB károsodást követően különböző szérum komponensek (valamint víz) kontrollálatlanul kerülhetnek az agyi parenchymába, ami akutan intrakraniális nyomásnövekedéshez, krónikusan neuroinflammációhoz és következményes neuronális diszfunkcióhoz (pl. kognitív zavar) vezethet.⁸ A koponya-agysérülés leggyakoribb formája, az enyhe koponya trauma (mTBI) jellegzetesen csak átmeneti BBB zavart okoz, a hagyományos képalkotó eljárásokkal nincs kimutatható organikus következménye.⁹ Korábbi vizsgálatok szerint különböző komorbid tényezők fokozzák a traumás agykárosodás káros hatásait¹⁰, ezáltal hosszabb intenzív ellátást és a lehetséges szövődmények fokozott előfordulását eredményezve. A TBI-t szenvedett betegek leggyakoribb komorbid tényezője a Magyarországon is népbetegségnek számító magasvérnyomás betegség,^{11,12} amely a vér-agy gát

károsodását kialakulását vagy fokozódását idézheti elő. Például idős hipertóniás egerekben korábban kimutattuk, hogy azonos életkorú normotenziós állatokkal összehasonlítva a BBB fokozott károsodása figyelhető meg, ami következményes neuroinflammáció és kognitív zavar kiváltó oka lehet¹³.

2. Hipotézisek

A traumás agykárosodás az agyszövet mitokondriális diszfunkcióját idézi elő, ami excesszív mitokondriális hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelődéshez vezet¹⁴. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a H_2O_2 erős értágító hatással rendelkezik az agyi vaszkulátúra különböző erein¹⁵. Ezen dilatátort hatás részben a myogén válasz negatív regulátoraként ismert, a kalcium-aktivált kálium csatorna aktivációja mediálja¹⁶. Ezek alapján jelen kutatásunkban azt hipotetizáltuk, hogy a TBI-t követő mitokondriális H_2O_2 -nek központi szerepe van az agyi erek TBI-indukálta myogén diszfunkciójában, valamint célul tűztük ki a háttérben álló celluláris mechanizmusok tisztázását. Szintén feltettük, hogy magasvérnyomás egyidejű fennállása esetén az enyhe koponya trauma a vér-agy gát krónikus zavarához vezethet, ami az agyi parenchymában felszaporodó szérumkomponensek révén neuroinflammációt és kognitív zavart indukál.

3. Célkitűzés: Célul tűztük ki, hogy a traumás agykárosodást követően tisztázzuk:

-a mitokondriális H_2O_2 szerepét agyi erek csökkent nyomás-indukálta myogén válaszában;

-a H_2O_2 pontos celluláris hatásmechanizmusát, különös tekintettel a kalcium aktivált kálium csatornák (BK_{Ca})^{15,16} szerepére;

-valamint célunk volt a H_2O_2 és a BK_{Ca} csatorna közötti pontos mechanisztikus kapcsolat feltárása.

- enyhe koponya trauma vér-agy gátra kifejetett hatásának vizsgálata normotenziós és hipertóniás patkányokban, és annak szerepének tisztázása a neuroinflammáció és kognitív zavar kialakulásában.

4. Módszerek:

Traumás agykárosodás állat-modell: A megfelelő etikai engedélyek birtokában TBI előidézésére a Marmarou-féle diffúz agykárosodás modellt használtuk. Ennek megfelelően egy plexiüveg csőben 450g súlyú fém hengert ejtettünk a traumán áteső hím 300-350g Wistar-Kyoto (WKY) patkányok koponyáján rögzített korongra 1,5m (súlyos) magasságból.

Izolált artéria cerebri media (MCA) nyomás indukálta válasza, farmakológiai kísérletek: Izolált artéria cerebri media (MCA) nyomás-indukálta myogén válaszait vizsgáltuk nyomás-myográfia alkalmazásával kontrol patkányokban valamint 24 órával súlyos koponya traumát követően. A különböző mediátorok szerepét a következő gátlószerek jelenlétében vizsgáltuk: mitokondriális szuperoxid szabad gyököket elimináló (ROS) mitoTEMPO (3×10^{-8} mol/L), a H_2O_2 -ot bontását végző kataláz (CAT, 120U/mL), BK_{Ca} csatorna blokkoló Paxilline (10^{-6} mol/L), és TRPV4 csatorna gátló HC067047 ($0,5 \times 10^{-6}$ mol/L). Ezt követően MCA H_2O_2 -indukálta dózis függő dilatációját váltottuk ki Paxilline és HC067047 jelenlétében. Szintén, dózis függő dilatációt idéztünk elő TRPV4 agonistával GSK1016790A Paxilline jelenlétében és hiányában. Az átmérő válaszok a 80 Hgmm-en mért passzív átmérő százalékos értékeként vannak kifejezve.

A vaszkuláris H_2O_2 termelést kontroll és koponya traumán átesett patkányok izolált MCA-nak fluoreszcens CM-H2DCFDA festését követően konfokális mikroszkóppal (Olympus Fluoview FV1000) vizsgáltuk.

Quantitative real-time RT-PCR: kontroll és koponya traumán átesett patkányok izolált MCA-ban a BK_{Ca} alegységeinek (alfa, beta) valamint a TRPV4 csatornák mRNS expresszióját vizsgáltuk.

BK_{Ca} csatorna funkció vizsgálata: izolált vaszkuláris simaizom sejteken patch-clamp módszerrel.

Statisztikai analízis: Statisztikai analízisre páros T-próbát vagy two way ANOVA-t használtunk. $P < 0.05$ esetén tartottuk a különbségeket szignifikánsnak. Az adatokat vagy mikrométerben vagy a passzív átmérő %-ban fejeztük ki (100%: Ca^{2+} mentes oldatban mért maximum átmérő 80 Hgmm-en). Az adatok átlag \pm SEM-ként vannak megadva.

Traumás agykárosodás állat-modell: A megfelelő etikai engedélyek birtokában TBI előidézésére a Marmarou-féle diffúz agykárosodás modellt használtuk. Ennek megfelelően egy plexiüveg csőben 450g súlyú fém hengert ejtettünk a traumán áteső hím spontán hipertóniás patkányokra (n=30) és ugyanolyan korú hím normotóniás Wistar patkányokra (n=30) a koponyájukra rögzített korongra 25cm magasságból.

Vérnyomás mérése: A kísérletben résztvevő állatok vérnyomását a fejbe ütés előtt és után is non-invazív módon farok mandzsettás vérnyomás mérővel altatásban végeztük.

Magatartás-vizsgálatok:

- Open field (OF) teszt: a patkányokat egy 60x60 cm-es, 40 cm magas falakkal körülvett négyzetalapú porondra helyeztük, és 3 percen át mértük az állatok horizontális és vertikális explorációs aktivitását, valamint sztereotípiás viselkedését.

- Novel object recognition (NOR) teszt: két próbából álló hosszútávú memória teszt. Az első próbában két egyforma tárgyat explorálhat az állat, enyhe megvilágítás mellett 3 percen át, majd a második próba során az egyik már ismert tárgyat és egy új tárgyat explorálhat szintén 3 percen át. Habitációs célból a kísérletet megelőzően az állatokat egy ülés erejéig nyílt porond explorációs tesztbe vontuk be.

Vér-agy gát funkció vizsgálata (BBB): Vér-agy gát áteresztő képességének meghatározását intraperitoneálisan beadott Evans Blue (2%, 7ml/kg) festékkel vizsgáltuk. Az agyi parenchyma homogenizálása után spektrofotométerrel detektáltuk a festék mennyiségét.

Western blot: A vér-agy gát áteresztő képességét az agyszövetbe kilépő fibrin mennyiségének western blot vizsgálatával is igazoltuk.

Quantitative Real-Time RT-PCR: IL-1, IL-6 és TNF-alfa mRNS expresszióját vizsgáltuk izolált agyszövet mintákban.

5. Eredmények

A mitokondriális H₂O₂ szerepe az agyi artériák myogén válaszában csökkenésében traumás agykárosodás után

A diffúz agysérülést követően 2 órával izolált MCA-k myogén válasza megmaradtak voltak, azonban 24 órával a fejbe ütés után szignifikánsan csökkent a myogén konstriktó az autoregulációs nyomástartományban (60-140 Hgmm) a kontrol patkányok MCA válaszaival összehasonlítva. A csökkent myogén konstriktó mitokondriális antioxidáns (mitoTEMPO) és catalase (CAT) jelenlétében a kontroll erek myogén konstriktójának szintjére állt vissza, a CAT és mitoTEMPO nem fejtett ki additív hatást a nyomás-indukálta konstriktó erősségére. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a traumás agykárosodást követően csökkent nyomás-indukálta konstriktor válasz csökkenés mitokondriális eredetű H₂O₂-nek tulajdonítható. Ezt a hipotézist támogatja, hogy a súlyos diffúz traumás agykárosodás eredményeink szerint szignifikánsan növelte a CAT-érzékeny cerebrovaszkuláris CM-H₂DCFDA festődést, fokozott H₂O₂ termelésre utalva.

BK_{Ca} csatorna szerepe agyi erek csökkent nyomás-indukálta konstriktójában súlyos traumás agykárosodást követően

Eredményeink szerint a BK_{Ca} csatorna gátlása Paxillinnel traumás agykárosodás után agyi erek myogén konstriktóját visszaállította a kontrol szintre. Azt találtuk, hogy paxillin jelenlétében izolált MCA-k H₂O₂-okozta dózis-függő dilatációjá szignifikánsan csökken. Ez arra utal, hogy a TBI-okozta emelkedett H₂O₂ szint a BK_{Ca} csatornán keresztül idézhet elő csökkent nyomás-indukálta konstriktót. Szintén kimutattuk, hogy TBI után a BK_{Ca} csatorna mindkét alegységének cerebrovaszkuláris expressziója fokozott, aminek szintén szerepe lehet a csatorna fokozott dilatátor hatásában traumás agykárosodás után.

A TRPV4 csatorna szerepe agyi erek csökkent nyomás-indukálta konstriktójában súlyos traumás agykárosodást követően

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TRPV4 csatorna érzékeny a környezet redox változására¹⁷, valamint képes a BK_{Ca} csatornát aktiválni¹⁸. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy traumás agykárosodás után a felszaporodó H₂O₂ a TRPV4 csatorna aktiválásán keresztül idézi elő a BK_{Ca} csatorna fokozott működését, és ezáltal a nyomás-indukálta konstriktó csökkenését. Elsőként mutattuk ki, hogy traumás agykárosodás után a csökkent cerebrovaszkuláris myogén konstriktó TRPV4 gátló (HC067047)

jelenlétében visszaáll a kontrol szintre. Szintén megmutattuk, hogy a H_2O_2 által előidézett MCA dilatáció csökken a HC067047 jelenlétében, valamint a TRPV4 agonista GSK1016790A indukálta dózis függő dilatáció gátolható BK_{Ca} csatorna blokkoló jelenlétében (Paxillin). A traumás agykárosodás nem csak funkcionálisan aktiválja a TRPV4 csatornákat, hanem szignifikánsan növeli az agyi erek simaizom sejtjeinek TRPV4 gén expresszióját is.

TRPV4 csatorna által közvetített H_2O_2 indukálta BK_{Ca} csatorna áram vaszkuláris simaizom sejten (VSMCs)

Patch clamp technika alkalmazásával azt találtuk, hogy izolált cerebrovaszkuláris simaizom sejteken a H_2O_2 szignifikánsan növeli a BK_{Ca} csatorna aktivitását, ami a TRPV4 csatorna szelektív gátlószerének jelenlétében megelőzhető. A H_2O_2 -nek nincs hatása a BK_{Ca} csatorna aktivitásra paxilline jelenlétében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a H_2O_2 a TRPV4 csatorna aktiválásán keresztül idézi elő a vaszkuláris simaizom BK_{Ca} csatornáinak fokozott működését.

Enyhe koponya trauma a vér-agy gát krónikus károsodásához vezet spontán hypertóniás patkányokban

Spontán hypertóniás patkányok vérnyomása szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollként használt normotenziós Wistar patkányoké. Az enyhe koponya trauma nem volt hatással a vérnyomás értékekre. Enyhe traumás agykárosodást követően két héttel a magas vérnyomásos patkányokban (n=7) szignifikáns ($p<0.05$) vér-agy gát károsodásra utaló Evans blue extravazáció volt megfigyelhető, míg festék kilépést a normotóniás patkányokban (n=7) nem észleltünk. Szintén, két héttel az enyhe koponya traumát követően fibrin agyszöveti akkumulációját mutattuk ki spontán hypertóniás patkányokban (n=6), ami a normotenziós kontroll állatokban nem volt kimutatható (n=6, $p<0.05$).

Enyhe koponya trauma perzisztáló neuroinflammációt okoz spontán hypertóniás patkányokban

A gyulladáshoz kapcsolódó citokinek IL-1, IL-6 and TNF szintje szignifikánsan ($p<0.05$) magasabb volt mind az agykéregben mind a hippocampusban

magas vérnyomásos patkányokban két héttel enyhe koponya trauma után (n=8), mint a TBI nélküli hypertóniás (n=8) és a kontrol normotóniás állatokban TBI-vel (n=8) és anélkül (n=8).

Enyhe koponya trauma perzisztáló kognitív zavart okoz spontán hypertóniás patkányokban

Az OF teszt során két héttel enyhe koponya traumát követően a normotenzív patkányok (n=11) szignifikáns ($p<0.05$) habituációt mutattak, ami intakt tanulásra és memóriefunkcióra utal. Ezzel szemben a spontán hypertóniás állatok (n=11) enyhe TBI után két héttel nem mutattak habituációt, ami a tanulás és memóriefunkció károsodására utal. Ezt konfirmálja, hogy a NOR teszt során az intermedier deklaratív memóriát jelző diszkriminációs index (DI) szignifikánsan ($p<0.05$) csökkent spontán hypertóniás patkányokban (n=11) két héttel enyhe koponya traumát követően. Normotenzív állatok (n=11) DI értéke nem mutatott eltérést enyhe koponya trauma után, intakt memória működésre utalva.

6. Megbeszélés

Jelen vizsgálatainkban azt találtuk, hogy súlyos diffúz koponya-agy sérülést követően 24 órával a agyi erek nyomás-indukálta myogén konstriktója károsodott. A csökkent autoregulációs működés fontos kórélettani szerepet játszhat a másodlagos agykárosodás kialakulásában: 1.) megnövekedett vértérfogathoz vezet, ezzel hozzájárulhat az intrakraniális nyomás növekedéséhez a zárt koponyatérben; 2.) a myogén mechanizmusú rezisztencia-növekedés hiányában a vérnyomás növekedése akadálytalanul tevődik át az agyi mikrocirkulációra, elősegítve a vér-agy gát károsodását és súlyosbítva a vasogén ödéma kialakulását. Eredményeink szerint a diffúz traumás agykárosodást követő fokozott mitokondriális H_2O_2 termelés felelős az agyi erek csökkent nyomás-indukálta érválaszaiért. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TBI-t követő fokozott excitotoxicitás, a csökkent perfúzió és a következményes metabolikus szétkapcsolás jelentős agyszöveti mitokondriális oxidatív stresszt idéz elő.^{19,20} Azt találtuk, hogy traumás agykárosodás után a H_2O_2 szintje szignifikánsan megemelkedik az agyi artériák simaizom rétegében is, aminek elbontása catalase-zal a csökkent myogén válasz kontrol szintre történő visszaállásához vezet.

Eredményeink szerint a H_2O_2 hatásában az érfali calcium aktivált kálium csatornáknak (BK_{Ca}) és a tranziens receptor vanilloid csatorna 4 (TRPV4)-nek központi szerepe van. Ezt bizonyítja, hogy mindkét csatorna gátlása a TBI-okozta csökkent myogén konstriktiót visszaállítja. Hipotézisünk szerint a felszabaduló mitokondriális H_2O_2 aktiválja a cerebrovaszkuláris simaizom TRPV4 csatornáit, amik a BK_{Ca} csatorna aktiválásán keresztül a simaizom hyperpolarizálódásához és ezáltal a myogén konstriktió gyengüléséhez vezetnek. Ezt támogatja, hogy a H_2O_2 -indukálta MCA dilatáció blokkolható a BK_{Ca} és TRPV4 gátló jelenlétében, a TRPV4-agonista indukálta vasodilatáció nem váltható ki BK_{Ca} gátló jelenlétében, valamint a cerebrovaszkuláris simaizom BK_{Ca} ionáramai (patch clamp) TRPV4 függő aktivációt mutatnak H_2O_2 jelenlétében.

Jelen bemutatott eredményeink szerint artériás hipertonia jelenléte esetén enyhe koponya trauma hatására perzisztáló vér-agy gát zavar alakul ki, aminek oki szerepe lehet az ezekben a kísérleti állatokban megfigyelt kognitív diszfunkcióval. Ezen eredmények felvetik, hogy a magasvérnyomásos enyhe koponya traumát szenvedett betegek a normotenziós betegektől eltérő diagnosztikai eljárásokat és terápiás beavatkozásokat igényelhetnek. Eredményeink szintén felvetik, hogy egyéb gyakori komorbid tényezők, pl. diabetes, obesitas stb. Hasonló hatást fejthetnek ki enyhe koponya trauma után. Az enyhe TBI és a hipertonia szinergista hatásának mechanizmusa a BBB károsodásában nem tisztázott. Mindkét kórállapot fokozott cerebrovaszkuláris szabadgyök termeléssel jár²¹⁻²³, aminek direkt szerepe lehet a BBB-t alkotó tight junction-fehérjék károsodásában²⁴, valamint proteolitikus mátrix metalloproteináz enzimeket aktiválhatnak²⁵, amik a barrier funkció további romlását eredményezhetik. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a vér-agy gát károsodása szérum komponensek agyszövetbe jutása révén okozhat neurológiai diszfunkciót. Például olyan egerekben, akikben perycita-deficiencia miatt áll fenn BBB zavara fibrin agyszöveti depozíciója a monocyt/macrophage rendszer aktivációját idézi elő, fokozott microglia aktivációt és szabadgyök képződést idéz elő, ami tovább növeli a fent említett redox-szenzitív proteolitikus folyamatokat és gyulladásszerű cytokinek termelődését²⁶. Az említett eredményekhez hasonlóan kimutattuk, hogy enyhe koponya trauma

magasvérnyomás egyidejű jelenléte esetén a krónikus BBB zavar mellett fibrin felszaporodáshoz vezet spontán hypertóniás patkányok cortikális és hippocampalis állományában. A fibrin felszaporodásához asszociáltan enyhe koponya traumát szenvedett magasvérnyomásos állatok agyszöveti gyulladásos cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF α) termelése is fokozódik a traumán nem áteső hypertóniás és normotóniás társaikhoz képest. A gyulladásos cytokinek további BBB károsodást okozhatnak²⁷, bezárva ezzel egy pozitív feed-back elven erősödő pathológiás folyamatot. A krónikus neuroinflammáció axonális-dendritikus károsodáson, valamint a normál neurológiai funkciót szabályozó gének (Bdnf, Homer1, and Dlg4) diszregulációján keresztül^{28,29} központi szerepet játszhat a szinaptikus plaszticitás károsodásában és a kialakuló kognitív zavarban²⁸.

7. Összefoglalás

A súlyos diffúz agykárosodás fokozott cerebrovaszkuláris mitokondriális H₂O₂ termelődéshez vezet, ami BK_{Ca} csatornák TRPV4 függő aktivációján keresztül csökkenti az agyi erek nyomás-indukálta myogén konstriktációját.

Enyhe traumás agykárosodás magasvérnyomás egyidejű fennállása esetén a vér-agy gát krónikus zavarát okozza, amely toxikus anyagok felhalmozódásához vezet az agyi parenchymában, neuroinflammációt és kognitív zavart idézve elő. Mindez felveti, hogy a magasvérnyomásban (és esetleg egyéb komorbiditásban) szenvedő betegek enyhe koponya sérülés után a normotenzív betegektől eltérő diagnosztikus és terápiás megközelítést igényelnek.

8. Szerző publikációi (IF: 22,999):

1. **Szarka N**, Pabbidi MR, Amrein K, Czeiter E, Buki A, Koller 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 Submitted (*J Neurotrauma*. 2018. Apr 1;35(7):930-939. doi: 10.1089/neu.2017.5056)

2. **Szarka N**, Toth L, Czigler A, Kellermayer Z, Ungvari Z, Amrein K, Czeiter E, Bali Zs, Tadepalli A, Wahr M, Hernadi I, Koller A, Buki A and

Toth P. Single Mild Traumatic Brain Injury Induces Persistent Disruption of the Blood-Brain Barrier, Neuroinflammation and Cognitive Decline in Hypertensive Rats. (*Int J Mol Sci.* 2019 Jun 30;20(13):3223. doi: 10.3390/ijms20133223)

3. **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.* 2017 Jul 15;34(14):2315-2319. doi: 10.1089/neu.2016.4962.)

4. Toth P, **Szarka N**, Farkas E, Ezer E, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications (*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Nov 1;311(5):H1118-H1131. doi: 10.1152/ajpheart.00267)

5. Czigler A, Toth L, **Szarka N**, Szilágyi K, Kellermayer Z, Harcid A, Vecsernyes M, Ungvari Z, Szolics A, Koller A, Buki A, Toth P. Prostaglandin E2, a postulated mediator of neurovascular coupling, at low concentrations dilates whereas at higher concentrations constricts human cerebral parenchymal arterioles. (*Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 2020 Feb;146:106389. doi: 10.1016/j.)

6. 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 effects of the mitochondria-targeted antioxidative peptide SS-31. (*J Neurotrauma* 2019 Dec 1;36(23):3309-3315. doi: 10.1089/neu.2019.6439.)

7. **Szarka N**, Szellar D, Kiss Sz, Farkas N, Szakacs Zs, Czigler A, Ungvari Z, Hegyi P, Buki A, Toth P. Neuropsychological outcomes and quality of life of traumatic brain injury patients after treatment with growth hormone: A systematic review and meta-analysis. (*Under revision*)

8. Toth L, Czigler A, **Szarka N**, Toth P. The role of transient receptor potential channels in cerebral myogenic autoregulation in hypertension and

aging. (*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020 Jul 1;319(1):H159-H161. doi: 10.1152/ajpheart.00403.2020)

9. Szarka N, Oberling J, Vegh M, Nagy L. Patient satisfaction with care in gastroesophageal reflux disease. (*Orv Hetil.* 27;154(43):1713-8. 2013)

9. Köszönetnyilvánítás:

Először szeretném megköszönni mentoromnak, Dr. Tóth Péternek, aki személyesen felügyelte munkámat és végig bátorított a kutatás alatt. Megmutatta, hogyan váljak kutatóvá, segített megtanulni, hogyan kell a kísérleteket megtervezni és kivitelezni, valamint megtanított a kritikus gondolkodásra. Valamint szeretném megköszönni másik mentoromnak, Dr. Koller Ákos professzornak, aki mindvégig támogattam kutatásaim alatt.

Köszönöm minden kollégámnak: Dr. Czeiter Endrének, Amrein Krisztinának, és Dr. Czigler Andrásnak a segítséget és a támogatást. A kollaborációs munkát szeretném megköszönni Dr. Hernádi István kutatócsoportjának Pécsen, és a Pabbidi csoportnak Jackson, Mississippiben (USA).

Végül szeretném megköszönni a családomnak, akiknek köszönhetek mindent, aki vagyok, és végig támogattak munkám során.

10. Irodalomjegyzék:

- 1 Langlois, J. A., Rutland-Brown, W. & Wald, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation* **21**, 375-378 (2006).
- 2 Roozenbeek, B., Maas, A. I. & Menon, D. K. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* **9**, 231-236, doi:10.1038/nrneurol.2013.22 (2013).
- 3 Tagliaferri, F., Compagnone, C., Korsic, M., Servadei, F. & Kraus, J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta neurochirurgica* **148**, 255-268; discussion 268, doi:10.1007/s00701-005-0651-y (2006).
- 4 Menon, D. K. *et al.* Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* **91**, 1637-1640, doi:10.1016/j.apmr.2010.05.017 (2010).
- 5 Schwarzmaier, S. M. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **32**, 731-738, doi:10.1089/neu.2014.3650 (2015).
- 6 Greve, M. W. & Zink, B. J. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med* **76**, 97-104, doi:10.1002/msj.20104 (2009).

- 7 Sahuquillo, J., Poca, M. A. & Amoros, S. Current aspects of pathophysiology and
cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des* **7**, 1475-1503 (2001).
- 8 Alluri, H., Wiggins-Dohlvik, K., Davis, M. L., Huang, J. H. & Tharakan, B. Blood-
brain barrier dysfunction following traumatic brain injury. *Metab Brain Dis* **30**,
1093-1104, doi:10.1007/s11011-015-9651-7 (2015).
- 9 Li, W. *et al.* Spatiotemporal changes in blood-brain barrier permeability, cerebral
blood flow, T2 and diffusion following mild traumatic brain injury. *Brain research*
1646, 53-61, doi:10.1016/j.brainres.2016.05.036 (2016).
- 10 Kumar, R. G. *et al.* Epidemiology of Comorbid Conditions Among Adults 50
Years and Older With Traumatic Brain Injury. *J Head Trauma Rehabil* **33**, 15-24,
doi:10.1097/HTR.0000000000000273 (2018).
- 11 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).
- 12 Thompson, H. J., Dikmen, S. & Temkin, N. Prevalence of comorbidity and its
association with traumatic brain injury and outcomes in older adults. *Res Gerontol
Nurs* **5**, 17-24, doi:10.3928/19404921-20111206-02 (2012).
- 13 Toth, P. *et al.* Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular
injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *J Cereb Blood Flow
Metab* **33**, 1732-1742, doi:10.1038/jcbfm.2013.143 (2013).
- 14 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*
29, 1130-1137, doi:10.1038/jcbfm.2009.37 (2009).
- 15 Iida, Y. & Katusic, Z. S. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen
peroxide. *Stroke* **31**, 2224-2230 (2000).
- 16 Hayabuchi, Y., Nakaya, Y., Matsuoka, S. & Kuroda, Y. Hydrogen peroxide-
induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-
activated K⁺ channels. *Heart Vessels* **13**, 9-17 (1998).
- 17 Suresh, K. *et al.* Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular
endothelial cells involves TRPV4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **309**,
L1467-1477, doi:10.1152/ajplung.00275.2015 (2015).
- 18 Earley, S., Heppner, T. J., Nelson, M. T. & Brayden, J. E. TRPV4 forms a novel
Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels.
Circulation research **97**, 1270-1279, doi:10.1161/01.RES.0000194321.60300.d6
(2005).
- 19 Kim, J. J. *et al.* Phlorofucofuroeckol Improves Glutamate-Induced Neurotoxicity
through Modulation of Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction in
PC12 Cells. *PLoS One* **11**, e0163433, doi:10.1371/journal.pone.0163433 (2016).
- 20 Cao, Y. *et al.* Glutamate carboxypeptidase II gene knockout attenuates oxidative
stress and cortical apoptosis after traumatic brain injury. *BMC Neurosci* **17**, 15,
doi:10.1186/s12868-016-0251-1 (2016).

- 21 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* **30**, 789-796, doi:10.1089/neu.2011.2301 (2013).
- 22 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. *Journal of neurotrauma*, doi:10.1089/neu.2017.5056 (2018).
- 23 Pinto, C. C. *et al.* Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radic Res* **41**, 1151-1158, doi:10.1080/10715760701632816 (2007).
- 24 Schreibelt, G. *et al.* Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 3666-3676, doi:10.1096/fj.07-8329com (2007).
- 25 Haorah, J. *et al.* Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* **101**, 566-576, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04393.x (2007).
- 26 Montagne, A. *et al.* Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nature medicine* **24**, 326, doi:10.1038/nm.4482 (2018).
- 27 Rochfort, K. D. & Cummins, P. M. The blood-brain barrier endothelium: a target for pro-inflammatory cytokines. *Biochemical Society transactions* **43**, 702-706, doi:10.1042/BST20140319 (2015).
- 28 Cortese, G. P. & Burger, C. Neuroinflammatory challenges compromise neuronal function in the aging brain: Postoperative cognitive delirium and Alzheimer's disease. *Behavioural brain research* **322**, 269-279, doi:10.1016/j.bbr.2016.08.027 (2017).
- 29 Jaworski, T. *et al.* Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration. *The American journal of pathology* **179**, 2001-2015, doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.025 (2011).