dc_1398_17

MTA doktori értekezés

A cerebrális hemodinamika vizsgálata fiziológiás körülmények között, stroke rizikófaktorokban és stroke-ban

Dr. Oláh László



Debreceni Egyetem Klinikai Központ Neurológiai Klinika

Debrecen, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	
. BEVEZETÉS	
1.1. AZ AGYI KERINGÉS VIZSGÁLATA	5
1.1.1. Az agyi erek átmérőjét és az agyi vérátáramlást befolyásoló mechaniz	zmusok 5
1.1.2. A neurovaszkuláris kapcsolat és annak szabályozása	
1.2. A CEREBRÁLIS ISCHAEMIA PATOFIZIOLÓGIÁJA	
1.2.1. A cerebrális ischaemia fogalma. Az agyi anasztomózis rendszerek	
1.2.2. Az agyi perfúziócsökkenés esetén életbe lépő kompenzatorikus mech	anizmusok 24
1.2.3. A hipoxia/ischaemia okozta funkcionális és strukturális károsodás – a	enumbra
koncepció	
1.2.4. A különböző súlyosságú ischaemia mellett kialakuló sejtszintű változ	ások 26
1.2.5. A penumbra vizualizálása	
1.2.6. Az ischaemiás károsodás progressziója	
1.2.7. Az ischaemiás károsodás progressziójáért felelős tényezők	
1.2.8. Reperfúzió, reperfúziós károsodás	
1.2.9. Cerebrális reperfúziós károsodás mechanizmusa	
. CÉLKITŰZÉSEK	
2.1. ÁLLATKÍSÉRLETES MUNKÁINK HÁTTERE, MOTIVÁCIÓJA.	
ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI	
2.1.1. Állatkísérletes munkáink háttere – motiváció	
2.1.2. Állatkísérletes vizsgálataink célkitűzései	
2.2. HUMÁN VIZSGÁLATAINK HÁTTERE, MOTIVÁCIÓJA. HUMÁN	
TANULMÁNYAINK CÉLKITŰZÉSEI	
2.2.1. Humán vizsgálataink háttere – motiváció	
2.2.2. Humán vizsgálataink célkitűzései	
. MÓDSZEREK	
3.1. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINKHOZ HASZNÁLT KÍSÉRLE	TI
ÁLLATOK ÉS MÓDSZEREK	
3.1.1. Az angiotenzin hatásának vizsgálata egerekben permanens agyi ischa	emiában 43
3.1.2. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcs	olatának
vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában	
3.1.3. Átmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NA	AD szintre
egerekben	
3.2. HUMÁN TANULMÁNYAINKBA BEVONT ÖNKÉNTESEK ÉS AZ	
ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	
3.2.1. Az akut alkoholfogyasztás hatása az agyi hemodinamikai változásokr	a egészséges
személyekben ortosztatikus stressz során	
3.2.2. A dohányzás és a dohányzás elhagyásának hatása a vizuális stimuláci	ó kiváltotta
áramlási válaszra	
3.2.3. Az acetazolamid kiváltotta vazodilatáció hatása a neurovaszkuláris ka	pcsolatra 60
3.2.4. A hiperventiláció kiváltotta hipokapnia és NSAID készítmények hatá	sa a
neurovaszkuláris kapcsolatra	
3.2.5. Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza nyomtatot	t szöveg,
illetve Braille írás olvasásának a hatására	

4. EREDMÉNYEK	70
4.1. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEI	70
4.1.1. Az angiotenzin hatásának vizsgálata egerekben permanens agyi ischaemiábar	ı 70
4.1.2. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatánal	K
vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában	76
4.1.3. Átmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NAD szint	re
egerekben	87
4.2. HUMÁN TANULMÁNYAINK EREDMÉNYEI	91
4.2.1. Az akut alkoholfogyasztás hatása az agyi hemodinamikai változásokra egészs	séges
személyekben ortosztatikus stressz során	91
4.2.2. A dohányzás és a dohányzás elhagyásának hatása a vizuális stimuláció kivált	otta
áramlási válaszra	95
4.2.3. Az acetazolamid kiváltotta vazodilatáció hatása a neurovaszkuláris kapcsolati	ra 100
4.2.4. A hiperventiláció kiváltotta hipokapnia és NSAID készítmények hatása a	
neurovaszkuláris kapcsolatra	104
4.2.5. Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza nyomtatott szöveg	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
illetve Braille írás olvasásának a hatására	110
5. MEGBESZÉLÉS	117
5.1. ALLATKISERLETES VIZSGALATAINK EREDMENYEINEK MEGBESZELI	ESE
	117
5.1.1. Az anigotenzin hatása permanens ischaemiás stroke-ban	117
5.1.2. A rekanalizációs terápia fejlődése akut ischaemiás stroke-ban	119
5.1.3. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatánal	K
vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában	120
5.1.4. Atmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NAD szint	re
egerekben	129
5.1.5. Allatkiserletes megfigyeleseink ertekelese a klinikai eredmenyek tükreben	130
5.2. HUMAN TANULMANYAINK EREDMENYEINEK MEGBESZELESE	137
5.2.1. Rizikofaktorok hatasa az agyi veraramlas szabalyozasara	137
5.2.2. Az agyi rezisztenciaerek atmerőjet befolyasoló faktorok hatasa a neuronalis	140
aktivacio indukaita ervaiaszra	140
5.2.3. Lato es vak szemelyek PCA-ban merneto aramiasi valasza nyomtatott szoveg	, , 154
filetve Branne iras olvasasanak a natasara	154
5.2.4. Human tanuimanyaink eredmenyeinek az összelőgialása	128 120
0. UJ EKEDIMEN I EK, EKEDIMEN I EINK GI AKUKLATI HASZNUSITASA 6.1. jui ededménvek következtetések	100
6.1. OJ EKEDMENTEK, KOVETKEZTETESEK	100
7 IRODALOMIECVZÉK	102 164
8 KÖZLEMÉNVEK TUDOMÁNVMETRIALADATOK	101
8 1 AZ ÉRTKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	191
8 2 EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	192
8.3. FŐBB TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	195
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	198
	> •

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

a.: artéria ACA: arteria cerebri anterior ACE: angiotenzin-konvertáló enzim ADC: apparent diffusion coefficient AII: angiotenzin AT1: angiotenzin 1-es típusú receptora AT2: angiotenzin 2-es típusú receptora ATP: adenozin-trifoszfát AZ: acetazolamid CBF: agyi véráramlás CCD kamera: charge-coupled device kamera CO szén-monoxid CO₂: szén-dioxid COX: ciklo-oxigenáz CPS: agyi protein szintézis CT: computer tomográfia CVRi: cerebrovaszkuláris rezisztencia index DBP: diasztolés vérnyomás dHb: deoxihemoglobin DWI: diffúzió súlyozott képalkotás fTCD: funkcionális transzkraniális Doppler HR: szívfrekvencia HUT: head-up tilt teszt ICA: arteria carotis interna KO: knock-out (hiányos) mBP: artériás középvérnyomás

mBPMCA: az arteria cerebri media szintjére korrigált artériás középvérnyomás MCA: arteria cerebri media MCAO: arteria cerebri media okklúzió MFV: átlagos áramlási sebesség (mean flow velocity) MFVMCA: az arteria cerebri mediában mérhető átlagos áramlási sebesség MR: mágneses rezonancia NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid NIH: National Institutes of Health NIRS: near-infrared spektroszkópia NLC: nem-lexikális karakter NO: nitrogén-monoxid NOS: nitrogén monoxid szintetáz NSAID: nem steroid gyulladásgátló oHb: oxihemoglobin PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz PCA: arteria cerebri posterior PET: pozitron emissziós tomográfia PI: pulzatilitási index PWI: perfúzió súlyozott képalkotás SBP: szisztolés vérnyomás SPECT: single-photon emissziós computer tomográfia VEP: vizuális kiváltott válasz potenciál v.: véna wt: wild type (vad típus)

1. BEVEZETÉS

1.1. AZ AGYI KERINGÉS VIZSGÁLATA

A stroke a világ fejlett országaiban a morbiditási és mortalitási statisztikák egyik legfontosabb tényezője, emellett a hosszútávú rokkantság leggyakoribb oka. Jelenleg Magyarországon évente kb. 50 000 beteg kerül kórházba stroke miatt. Az akut stroke mortalitása az első hónapban 12-28%, az első évben 25-30%. A vérzéses stroke korai halálozása még magasabb, közel 50%. A stroke elsősorban az idősek betegsége, ezért idősödő társadalmunkban a betegség incidenciájának és prevalenciájának növekedésével kell számolnunk (Mihálka és mtsai., 1999; Szapáry, 2011). Mivel a stroke döntő többségét kitevő ischaemiás stroke hátterében az agy vérellátási zavara áll, a stroke eredményes kezeléséhez elengedhetetlen, hogy minél jobban megértsük az agyi keringés élettanát és kórélettanát, valamint a stroke korai fázisában zajló patofiziológiai folyamatokat.

Mint minden szerv vérellátásának, az agyi keringésnek is megvannak a maga sajátosságai. Jól ismert, hogy az agy a testtömegünk csupán 2%-a, mégis a perctérfogat közel 20%-ában részesül, melynek hátterében a működő agyszövet magas oxigén és energiaigénye áll. Ennek biztosításához, mivel az agy érdemi energiaraktározásra nem képes, folyamatos, mégis az aktuális metabolikus igényekhez igazodó vérellátásra van szüksége. Az a tény azonban, hogy az agy egy zárt térben, a koponyaüregben helyezkedik el, nem teszi lehetővé az agyi vértérfogat kontrollálatlan növekedését. Ezért az agyi véráramlásnak a mindenkori vérnyomástól függetlenül relatíve állandónak kell lennie, ugyanakkor a regionális agyi vérátáramlásnak az egyes agyi régiók aktivációjakor gyorsan kell alkalmazkodnia az agyszövet fokozott metabolikus szükségletéhez. A változó vérnyomásértékek mellett az agyi vérellátás állandóságát biztosító mechanizmust autoregulációnak, míg a neuronális aktiváció kiváltotta lokális vérátáramlás növekedésért felelős folyamatot neurovaszkuláris kapcsolatnak nevezzük. Mind az autoreguláció, mind a neurovaszkuláris kapcsolat hátterében a cerebrális rezisztenciaerek (mikroerek) vazokonstrikciós és vazodilatációs képessége húzódik meg, mely meglehetősen bonyolult szabályozás alatt áll (Szapáry, 2011; Hamar, 2011).

1.1.1. Az agyi erek átmérőjét és az agyi vérátáramlást befolyásoló mechanizmusok

Mint említettük, az agyi rezisztenciaerek keresztmetszetének változása révén az agy vérellátása a vérnyomás tág határai között relatíve konstans, ugyanakkor a regionális agyi vérátáramlás a neuronális aktivitás és a következményes szöveti metabolizmus változásához gyorsan tud alkalmazkodni (Rosengarten és mtsai., 2002b; Paulson és mtsai., 1990; Tomita és mtsai., 2002; Ryan és Rubanyi, 1992; Willie és mtsai., 2014; Filosa és mtsai., 2016).

A cerebrális erek tónusát és ezen keresztül a regionális agyi vérellátást három alapvető mechanizmus szabályozza:

- az érfali simaizomsejtek saját, intrinzik tulajdonságai (miogén szabályozás) (Paulson és mtsai., 1990, Iadecola, 2004; Willie és mtsai., 2014),
- az erek közelében lévő neuronok és asztrociták anyagcsere viszonyai, valamint egyéb humorális tényezők (metabolikus szabályozás) (Tomita és mtsai., 2002; Ryan és

Rubanyi, 1992; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002; Iadecola, 2004, Willie és mtsai., 2014; Filosa és mtsai., 2016),

 a perivaszkuláris idegek befolyása az agyi erekre (neurogén szabályozás) (Bennett és Gardiner, 1996; Willie és mtsai., 2014).

Természetesen a mikroerek átmérője a fenti szabályozási mechanizmusok eredőjeként alakul ki (**1. ábra**).



1. ábra A cerebrális rezisztenciaerek átmérőjét befolyásoló mechanizmusok. Az ábra azt jelzi, hogy bár kísérleti körülmények között a megváltozott vérnyomás, neuronális aktiváció, vérgáz értékek és egyéb humorális faktorok agyi érrendszerre gyakorolt hatása elkülöníthető, a mindennapi élet során egy integrált szabályozással kell számolnunk, melynek eredőjeként alakul ki az agyi mikroerek átmérője, s ezáltal a cerebrovaszkuláris rezisztencia.

1.1.1.1. Miogén szabályozás

A simaizomréteggel rendelkező prekapilláris rezisztenciaerek az intraluminalis nyomás növekedésére érfali konstrikcióval, az intraluminalis nyomás csökkenésére pedig dilatációval válaszolnak. Ez az úgynevezett Bayliss-effektus, amely in vitro körülmények között is kimutatható. A Bayliss effektus hátterében azt feltételezik, hogy a tunica intima endothelialis sejtjei a feszülés hatására parakrin módon jelet küldenek a simaizomsejteknek, melyek membránjának feszültségfüggő Na⁺ csatornái megnyílnak, s a beáramló Na⁺ ionok a sejtet depolarizálják. Emellett a térfogat-regulált klorid ion csatornák és a feszülés érzékeny non-szelektív kation csatornák is aktiválódnak, melyek működése feszültség-dependens Ca²⁺ csatornák megnyitását, s így a cytoplasma Ca²⁺ koncentrációjának növekedését eredményezi, és végső soron ez vezet az érfali simaizomsejtek kontrakciójához (Tomita és mtsai., 2002).

A Bayliss effektusnak kiemelkedő szerepe van az agyi véráramlás autoregulációjában, mely egy olyan önszabályozó mechanizmus, mely magas agyi perfúziós nyomásértékeknél a rezisztenciaerek vazokonstrikciója, míg alacsony nyomás esetén a kiserek vazodilatációja révén képes az agyi perfúziós nyomás széles határai között az agyi véráramlást közel állandó értéken tartani. Az autoreguláció tehát alacsony perfúziós nyomás esetén a vasodilatáció révén védi az agyszövetet a hipoxiától, magas perfúziós nyomás esetén pedig az erek vazokonstrikcióján keresztül gátolja a cerebralis ödéma kialakulását. Az autoreguláció alsó határa kb. 60-70 Hgmm, míg felső határa 140-150 Hgmm körüli artériás középvérnyomás értéknél van. Az autoregulációban fő szerepet játszó érfalon belüli, intrinzik miogén tényezők mellett a rezisztenciaerek átmérőjét metabolikus változások, perivaszkuláris neurogén tényezők és egyéb humorális hatások egyaránt jelentősen módosíthatják (Edvinsson és Krause, 2002; Paulson és mtsai., 1990; Willie és mtsai., 2014).

1.1.1.2. Metabolikus és humorális szabályozás

A regionális/lokális agyi véráramlás szabályozásában a központi idegrendszer sejtjeinek anyagcseretermékei és egyéb kémiai tényezők kiemelkedő szerepet játszanak. A metabolikus szabályozási elképzelés szerint az agy valamely területének az aktivációja az adott területben lévő neuronok és astrocyták anyagcseréjének fokozódását eredményezi. A fokozott metabolizmus következtében nő a vazodilatátor hatású anyagcseretermékek koncentrációja, mely a lokális vazodilatáció következtében a regionális véráramlás növekedését okozza (Fukuuchi és mtsai., 2001).

Élettani körülmények között a glükóz az agy legjelentősebb energiaforrása, de mivel az agy glükózt csak minimális mértékben raktároz, az agyi véráramlás megszűnésekor a rendelkezésre álló glükóz és glikogén néhány perc alatt felhasználódik. Emiatt az agy normális működéséhez folyamatos vérellátás szükséges, mely biztosítja a sejtek állandó glükóz ellátását. Mivel aerob körülmények között a glükóz lebontása és az ATP termelés oxidatív foszforilációval történik, az agyszövet működéséhez oxigénre is szükség van. Ha az agy hipoglikémiával és hipoxiával szembeni érzékenységét összehasonlítjuk, akkor megállapíthatjuk, hogy az agy jóval hosszabb ideig képes elviselni a hipoglikémiát irreverzibilis károsodás nélkül, mint a hipoxiát.

Ismert, hogy az artériás vér parciális oxigénnyomásának és az agyszövet lokális O₂koncentrációjának a csökkenése agyi vazodilatációt és véráramlás növekedést, míg a PaO₂ növekedése vazokonstrikciót és véráramlás csökkenést von maga után (Ryan és Rubanyi, 1992; Edvinsson és Krause, 2002). Az agyi rezisztenciaerek egyik legerősebb dilatátora mégsem a hipoxia, hanem a neuronok fokozott anyagcseréje során termelődő szén-dioxid (CO₂). A lokális szöveti CO₂-koncentráció 1%-os növekedése a PaCO₂ 30-80 Hgmm-es tartományában kb. 5%-os agyi véráramlás fokozódást eredményez. Ezzel szemben, hiperventiláció során a hipokapnia okozta vazokonstrikció révén az agy véráramlása akár 30-40%-kal is csökkenhet (Tomita és mtsai., 2002; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002; Iadecola, 2004; Willie és mtsai., 2014, Fukuuchi és mtsai., 2001).

A szén-dioxidon túl a szöveti pH csökkenése, vagyis a H^+ ionok, és a neuronális aktiváció okozta depolarizáció következtében extracellulárisan megemelkedett K^+ szint is aktivitás-függő véráramlásnövekedést von maga után. Bár a CO₂ számára a vér-agy gát átjárható, valószínű, hogy a lokális szén-dioxid-koncentráció növekedése a lokális extracelluláris kémhatás savi irányba történő módosítása révén okozza az agyi erek simaizomzatának ellazulását, s így vezet az áramlás fokozódásához (Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002; Willie és mtsai., 2014).

Az ATP felhasználása során keletkező adenozin izolált agyi artériákon és arteriolákon szignifikáns értágulatot eredményez, s in vivo is szignifikáns cerebrális vazodilatációt és következményes áramlásnövekedést találtak humán tanulmányokban. Az adenozin hatása a cerebrovaszkuláris rendszerben az agyi mikroereken kimutatott Al és A2 receptorokon

keresztül valósul meg, s hatását, legalábbis részben, feltehetően a szarkolemmális Na⁺ és K⁺ pumpára gyakorolt gátlása révén fejti ki (Tomita és mtsai., 2002; Ryan és Rubanyi, 1992; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002; Pelligrino és mtsai., 2011).

A tejsav az adenozinhoz hasonlóan vazodilatátor hatású metabolit, mely az anaerob glükolízis révén jelentős koncentrációt érhet el. A központi idegrendszerben a gliasejtek (asztrociták) metabolizálják a glükózt, melyet részben laktáttá alakítanak a glükolízis során. A gliasejtek által szintetizált laktátot a szomszédos aktivált, glumáterg neuronok felveszik és energiaforrásként hasznosítják. A laktát termelés fokozódása (pl. agyi ischaemia) és/vagy a felhasználás csökkenése a vér pH-ját acidózis irányába módosítja, s ezáltal az agyi vérátáramlást növeli (Tomita és mtsai., 2002; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002).

Az anyagcsere metabolitokon túl egyéb, nagyrészt endotheliális eredetű kémiai anyagok is jelentős szerepet játszanak az agyi rezisztenciaerek átmérőjének és így az agyi keringésnek a szabályozásában, úgymint a nitrogén-monoxid (NO), endothelin (ET-1), prosztaciklin (PGI), stb. (lásd **1. és 2. táblázat**), melyek közül a következő oldalakon csak a legfontosabbakat említem.

Az NO az egyik leggyakrabban vizsgált vazodilatátor, melynek szintézisét az NOszintáz (NOS) enzim végzi. A NOS különböző izoformái közül a központi idegrendszer sejtjeiben és az endothelben az állandóan aktív, konstitutív forma található. Az enzim sejtmembránhoz kötött, így az NO a képződését követően gyorsan az extracelluláris térbe jut. Féléletideje rövid, csupán másodpercekben mérhető. Gáz halmazállapotú lévén akadály nélkül átdiffundál a membránokon. Számos molekula (acetil-kolin, szerotonin, hisztamin, bradikinin, substance P, neuropeptid Y) az NO koncentráció emelése révén képes vazodilatációt kiváltani (Bennett és Gardiner, 1996). Az endothelsejtben termelődő NO az érfal simaizomrétegébe diffundálva fejti ki hatását. Szerepet játszik mind az agy nyugalmi véráramlásának fenntartásában, mind a különböző stimulusokra jelentkező vazodilatatív érválasz kialakulásában. A NOS gátlása fokozza a perifériás ellenállást és csökkenti az agyi véráramlást, s gyakorlatilag teljesen megszünteti a CO₂ indukálta agyi vazodilatációt. Ennek az a magyarázata, hogy az NO szükséges a CO₂ kiváltotta vazodilatációban kulcsszerepet játszó érfali simaizom ATP függő és Ca²⁺ függő K⁺ csatornái működéséhez (Edvinsson és Krause, 2002; Iadecola, 2004; Fülesdi és mtsai, 2015; Filosa és mtsai., 2016; Sándor, 2015).

További endothelfüggő vazodilatátor anyag a prosztaciklin és számos egyéb prosztanoid. Az arachidonsav metabolitjai, melyeket közös néven eikozanoidoknak nevezünk, fontos szerepet játszanak az agyi érátmérők szabályázásában. Az arachidonsav több enzim szubsztrátja: átalakítását a lipoxigenáz, a citokróm P450, vagy a ciklo-oxigenáz (COX) enzimek végezhetik. Az agyi keringésre ható eikozanoidok közül külön kell foglalkoznunk a ciklo-oxigenáz és a prosztaglandin-H-szintáz útvonalon képződő prosztanoidokkal. A különböző sejtekben, attól függően, hogy az adott sejtben az arachidonsav és a prostaglandin metabolizmusáért felelős enzimek közül melyek találhatók, más és más hatású molekulák képződnek (pl. az endothelsejtek főként prosztaciklint, a trombociták pedig tromboxánt szintetizálnak). Egyes prosztanoidok vazodilatációt, míg mások vazokonstrikciót eredményeznek: vazodilatátor hatású a PGI₂, a PGE₂ és a PGD₂, míg a TXA₂, a PGH₂ és a PGF₂ vazokonstriktor hatással bír (Bennett és Gardiner, 1996; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002; Sándor, 2015; Varga és mtsai., 2016). A vazodilatátor prosztanoidok közül külön meg kell említenünk a rövid féléletidejű prosztaciklint, melyet az endothelsejtek és az érfali simaizomsejtek termelik.

Ugyancsak az endothelsejtekben képződik az endothel-eredetű hiperpolarizáló faktor, mely szintén vazodilatátor hatással rendelkezik.

Az endogén szén-monoxid (CO) a hemből hem-oxigenáz enzim hatására képződik. Egyrészt a CO az érfali simaizomzat relaxációját eredményezve vazodilatációt okoz, másrészt képes az NO-szintázhoz kötődni és az NO-szintézis gátlása révén vazokonstrikciót is eredményezhet. Állatkísérletben kis koncentrációjú CO belélegeztetése fokozza az agyi véráramlást, mely hatás az endotheltől független (Sándor, 2015).

Vazodilatátorok	Származásuk helye
Acetil-kolin (Ach)	neuronok
Adenozin	neuronok, asztrociták, egyéb sejtek
Calcitonin G related peptide (CGRP)	neuronok
Szén-dioxid (CO ₂)	vér, neuronok, asztrociták
Gamma-amino-vajsav (GABA)	interneuronok
Kálium ion (K ⁺)	neuronok, asztrociták
Nitrogén-monoxid (NO)	neuronok, endotheliális sejtek
Laktát	asztrociták, vér
Prosztaglandin E2 (PGE2), H2 (PGH2)	neuronok, asztrociták, vaszkuláris
	simaizomsejtek
Prosztaciklin (PGI2)	endotheliális sejtek, vaszkuláris simaizomsejtek
Substance P (SP)	neuronok
Vazoaktív intestinális polypeptid (VIP)	interneuronok
Epoxy-eicosa-tetraensav (EET)	asztrociták, vaszkuláris simaizomsejtek
Acidózis (alacsony pH)	vér
Endothel eredetű hiperpolarizáló faktor	endothel

1. táblázat: Fő vazodilatátor hatású metabolikus tényezők, neurotranszmitterek és azok származási helyei.

Az eddig ismert legerősebb endothel eredetű vazokonstriktor az endothelin-1 (ET-1), amely jelentősen emeli a szisztémás vérnyomást. Szekréciója az endothelsejtek bazális membránja, vagyis az érfal felé történik. Az érfali simaizomsejtekben specifikus ET-1receptorok találhatók, melyek a foszfolipáz-C-t aktiválják, és az inozitol-trifoszfát útvonalon növelik az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt, s így váltanak ki vazokonstrikciót (Ryan és Rubanyi, 1992; Edvinsson és mtsai., 1993; Edvinsson és Krause, 2002).

További endothelfüggő vazokonstriktor a hipoxia által indukált endothel eredetű konstriktor faktor, mely hatását feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon fejti ki.

A szén-dioxid, oxigén, adenozin, nitrogén-monoxid, endothelin és pH újabb koncepció szerint egységes szabályozó rendszert alkotnak. Mint korábban említettük, az NO az egyik legtöbbet vizsgált vazodilatátor molekula, melynek termelődéséért egy kálcium dependens enzim, az NO-szintáz (NOS) felelős. A CO₂, Ach, hipoxia, ADP, bradikinin az intracelluláris Ca²⁺-szint emelésével aktiválják az endotheliális NOS-t, ezáltal fokozzák az NO szintézist, mely hatására a vaszkuláris simaizomsejtek elernyednek, így a rezisztenciaerek vazodilatációja és következményes vérátáramlás növekedés jön létre. Ezzel szemben az éren belüli nyírófeszültség, oxigén, trombin és a TGF-β a prae-proendothelin endothelinné való átalakulását fokozza, mely vazokonstriktor hatású. Az NO és az endothelin hatás közötti egyensúly eltolódása az egyik lényeges mechanizmus az agyi vérátáramlás szabályozásában (Katona és mtsai., 2006; Fülesdi és mtsai., 2015, Zhu és mtsai., 2016).

Szarmazasi nergen	
Vazokonstriktorok	Származásuk helye
Neuropeptid Y (NPY)	neuronok
Noradrenalin (NA)	locus coeruleus neuronjai
Alkalózis (lúgos pH)	vér
Szerotonin	raphe magvak neuronjai
Tromboxán A2 (TXA2)	trombocita
Szomatosztatin	neuronok
20-Hydroxy-eicosa-tetraensav (20-HETE)	asztrociták, vaszkuláris simaizomsejtek
Dopamin	interneuronok
Prosztaglandin F2 alfa (PGF2α)	endothelsejt
Endothel eredetű konstriktor faktor	endothelsejt

2. táblázat: Fő vazokonstriktor hatású metabolikus tényezők, neurotranszmitterek és azok származási helyei.

1.1.1.3. Neurogén szabályozás

Ismert, hogy az agyi erek falához szinaptikus vezikulákban gazdag perivaszkuláris idegek futnak. A szinaptikus vezikulákban többféle neurotranszmittert tudtak kimutatni, melyeknek a receptorait is megtalálták az agyi erek falában, s megállapították, hogy a miogén és metabolikus szabályozás mellett az idegi szabályozás is fontos szerepet tölt be az agyi vérkeringés regulációjában (Bennett és Gardiner, 1996).

Az elmúlt évtizedekben bebizonyosodott, hogy az agyi erekhez futó perifériás eredetű idegrostok szimpatikus, paraszimpatikus, valamint trigeminális eredetű szenzoros rostok lehetnek. Igazolták, hogy míg a szimpatikus idegek ingerlése csökkenti, a paraszimpatikus rostok ingerlése fokozza az agyi véráramlást (Ryan és Rubanyi, 1992; Paulson és mtsai., 1990; Edvinsson és Krause 2002; Bennett és Gardiner, 1996; Willie és mtsai., 2014). Emellett a központi idegrendszer több területéről, mint a locus coeruleusból, a nucleus fastigiiból, a dorsalis raphe magvakból, s a medulla oblongata területéről is futnak rostok az agyi erekhez (Ryan és Rubanyi, 1992; Paulson és mtsai., 1990; Edvinsson és Krause 2002; Bennett és Gardiner, 1996; Willie és mtsai, 2014; Sándor, 2015).

A szimpatikus eredetű posztganglionáris rostok egészen a prekapilláris rezisztenciaerekig beidegzik az artériás oldalt, s az is jól ismert, hogy az elülső keringési rendszer, vagyis a carotis rendszer szimpatikus beidegzése jóval gazdagabb, mint a hátsó, vertebrobaziláris rendszeré (Bennett és Gardiner, 1996).

Míg a szimpatikus rendszer vezikuláiról kimutatták, hogy noradrenalint tartalmaznak, addig a nem szimpatikus eredetű idegvégződések vezikuláiban 5-hidroxi-triptamint, acetil-

kolint, és különböző peptideket találtak (Bennett és Gardiner, 1996). A neurotranszmitterek azonosítása a perivaszkuláris idegvégződésekben azt eredményezte, hogy az idegrostok korábbi centrális és perifériás, szimpatikus és paraszimpatikus, vazokonstriktor és vazodilatátor felosztása mellett egyre inkább a neurotranszmitter tartalom alapján történik a klasszifikáció. Mi több, az újabb és újabb neurotranszmitterek és neuromodulátor molekulák felfedezésével a már jól ismert adrenerg, kolinerg, szerotoninerg, dopaminerg rostok mellett nitrogen-monoxidot tartalmazó nitrit-oxiderg és különböző peptiderg idegvégződéseket is leírtak (Ryan és Rubanyi, 1992)

A peptiderg rostokról kimutatták, hogy hatásuk nem egyszerűsíthető le a két alapvető érválaszra, vagyis a vazokonstrikcióra és a vazodilatációra, mivel moduláló hatásuk révén képesek befolyásolni az egyéb neurotranszmitterek hatását. A neuropeptidek általában más neurotranszmitterekkel és/vagy más neuropeptidekkel együtt vannak jelen. A szimpatikus idegekben a vazokonstriktor természetű noradrenalin mellett a szintén konstriktor hatású neuropeptid Y és szerotonin, míg a paraszimpatikus idegekben a vazodilatátor hatású acetil-kolin mellett az ugyancsak dilatátor vazoaktív intesztinalis polipeptid és nitrogén-monoxid található. A szenzoros idegekben szintén vazodilatációt előidéző peptideket mutattak ki, ezek a substance P, cholecystokinin, calcitonin gene related peptid és neurokinin-A (Paulson és mtsai., 1990, Sándor, 2015).

Itt kell megjegyezni, hogy az agy legfontosabb excitatorikus neurotranszmitterének számító glutamátot tartalmazó rostokat nem sikerült kimutatni és az agyi mikroereken sem találtak specifikus glutamát receptorokat, mi több direkt érhatást sem tudtak kimutatni nagy glutamát koncentráció mellett sem (Ryan és Rubanyi, 1992; Sándor, 2015). A glutamát a fentiek ellenére mégis vazodilatációt és következményes vérátáramlás növekedést eredményez, melyet NMDA-receptor blokkolók gátolnak. A fentiekből érthető, hogy a glutamát okozta érválasz indirekt úton valósul meg: a glutamát döntően az NMDA receptorhoz kapcsolódva növeli az intracelluláris Ca²⁺ szintet, ami a neuronális nitrogén-monoxid szintetáz (nNOS) és a foszfolipáz A2 aktivációját eredményezi. Az nNOS aktiváció a nitrogén-monoxid (NO), a foszfolipáz A2 az arachidonsav és ezen keresztül vazoaktív prosztaglandinok képződéséért felelős (Tomita és mtsai., 2002).

1.1.2. A neurovaszkuláris kapcsolat és annak szabályozása

A neurovaszkuláris kapcsolat a neuronális aktivációra bekövetkező regionális agyi vérátáramlás fokozódását, azaz a funkcionális hiperémiát jelenti (Roy és Sherrington, 1890). Erre a folyamatra az egyik legjobb példa a vizuális inger kiváltotta áramlásnövekedés a látókéregben. A vizuális stimuláció (pl. olvasás) hatására a látókéreg neuronjai aktiválódnak, így különböző neurotranszmitterek és vazoaktív mediátorok (pl. glutamát, kálium ion, hidrogén ion, nitrogén-monoxid) szabadulnak fel. A fokozott metabolizmus következtében a neuronok oxigén, glükóz, ATP felhasználása fokozódik, CO₂, tejsav és adenozin keletkezik. A fenti folyamatok hatására a rezisztenciaerek lokális vazodilatációja jön létre, melynek következtében az aktivált szövetet ellátó artériában – vizuális stimuláció esetén az cerebri posteriorban (PCA) – nő a vérátáramlás, s ezáltal a véráramlási sebesség is (Rosengarten és mtsai., 2002b; Girouard és Iadecola, 2006; Filosa és Blanco, 2007).

A neurovaszkuláris kapcsolat létezését először Roy és Sherrington írta le 1890-ben (Roy és Sherrington, 1890). Az elmúlt évtizedekben intenzíven vizsgálták a neuronális aktiváció és a regionális agyi vérátáramlás kapcsolatát, de a pontos celluláris mechanizmus részleteiben máig nem ismert (Rosengarten és mtsai., 2002b; Iadecola, 2004; Girouard és Iadecola, 2006; Koehler és mtsai., 2006; Filosa és Blanco, 2007; Busija és mtsai., 2008; Koehler és mtsai., 2009; Leithner és mtsai., 2010). A neuronális aktiváció indukálta regionális áramlási válasz hátterében a neuronok, a glia (asztrociták), az endothelsejtek és a vaszkuláris simaizomsejtek vagy periciták jól összehangolt működése áll, ezeket a sejteket együttesen neurovaszkuláris egység névvel is illetik **(2. ábra).** A neurovaszkuláris kapcsolatért felelős vazoaktív mediátorok között találunk különböző ionokat, metabolikus anyagcseretermékeket, humorális faktorokat és neurotranszmittereket (Iadecola, 2004; Koehler és mtsai., 2006).



2. ábra A neurovaszkuláris egység alkotásában részt vevő sejtek: asztrocita, neuron, endothel, pericita vagy vaszkuláris simaizomsejt. Figyelmet érdemel az asztrocita központi elhelyezkedése, mely alapján feltételezik, hogy az asztrocitának koordináló, szabályozó, összehangoló szerepe van a neurovaszkuláris kapcsolat működésében. (Ishiyaku ábrája nyomán, módosítva. https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/a yumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=28 6230&AC=8639)

A neuronális aktiváció során kialakuló akciós potenciálok hatására létrejövő ionáram következménye az extracelluláris K⁺ koncentrációjának a növekedése. Az extracelluláris K⁺ koncentráció 8-10 mmol/L-rel történő emelkedése mind in vitro, mind in vivo körülmények között az arteriolák tágulását okozza. Tartós aktiváció során az ATP-szint csökkenése az ATP-szenzitív K⁺ csatorna megnyílását eredményezi az ereken, mely szintén vazodilatációhoz vezet (Girouard és Iadecola, 2006; Koehler és mtsai., 2006; Filosa és Blanco, 2007; Leithner és mtsai., 2010).

A neuronális aktiváció során fellépő megnövekedett energiaigény relatív oxigén és glükóz hiányt okozhat. Míg a csökkent oxigénszint csak csekély mértékben és nem tartósan növeli meg a vérátáramlást, a fokozott metabolizmus során képződő CO₂ és az ATP katabolizmusa következtében keletkező adenozin már olyan potens vazodilatátorok, amelyek szerepet játszanak a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásában. Az agyi aktiváció során keletkező laktát szintén fontos mediátor lehet, mely a H⁺ koncentráció emelkedését eredményezve okoz vazodilatációt. A fentieken túl a neuronális aktiváció során felszabaduló vazoaktív neurotranszmitterek is hozzájárulnak a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges vazodilatációhoz (Metea és Newman, 2006). Ezek a neurotranszmitterek egyrészt a helyi interneuronokból, másrészt a távoli magokból származnak és szabályozzák az agyi véráramlást. Ismert továbbá, hogy a glutamát receptorok aktivációja vazodilatációt és következményes vérátáramlás növekedést eredményez. A neocortexben és a hippocampusban

az exogén glutamát vagy N-metil-D-aspartát (NMDA) a piális arteriolák és a cerebrális mikroerek tágulását eredményezik, mely folyamat NMDA-receptor blokkolókkal gátolható. A glutamát, receptorához kapcsolódva az intracelluláris Ca²⁺- szint emelkedését váltja ki, ami a neuronális nitrogén-monoxid szintetáz (nNOS), és a foszfolipáz A2 enzimet is aktiválja, mely enzimek az NO és vazoaktív prosztaglandinok révén járulnak hozzá a vazodilatációhoz (Girouard és Iadecola, 2006; Koehler és mtsai., 2006; Filosa és Blanco, 2007).

1.1.2.1. A neurovaszkuláris kapcsolat szabályozásának új szempontjai

Meg kell említeni, hogy Roy és Sherrington metabolikus szabályozás hipotézisének elsődleges szerepét a neurovaszkuláris kapcsolat hátterében egyre kevésbé fogadják el. Ennek két fő oka, hogy az agyszövet aktivitását kísérő véráramlás növekedés sokkal nagyobb, mint ami az anyagcsere fokozódása, valamint az O₂-felhasználás alapján várható lenne, továbbá az áramlásváltozás sokkal gyorsabban következik be, mint ahogy a vazodilatációért felelős metabolikus végtermékek koncentrációja emelkedik. Ez azt jelenti, hogy a neuronális aktiváció kiváltotta áramlásnövekedés és a metabolikus változások sem mértékükben, sem időbeli lefolyásukban nincsenek egymással összhangban (Ryan és Rubanyi, 1992, Edvinsson és Krause, 2002, Sándor, 2015). A centrális neuronok másodperc tört része alatt bekövetkező gyors aktivációját az agyi véráramlás változása 1-2 másodperc alatt követi. Ez a gyors aktiváció gyors energiatermelést kíván, mely feltehetően az oxidatív foszforilációnál sokkal kevésbé gazdaságos, de jóval gyorsabb glükolízisen keresztül valósul meg. Feltételezik, hogy ebben a folyamatban az asztrocitáknak jelentős szerepük van. Bár az agy kevés glikogént raktároz, de az főként az asztrocitákban történik, ahol a glikogén és glükóz lebontása az anaerob glükolízis révén gyors ATP termelést tesz lehetővé. A neurovaszkuláris kapcsolat során a glükolízis fontosságát támogatja az a tény is, hogy a fokozott agyi aktivitás kiváltotta anyagcsereváltozás és a regionális agyi véráramlás fokozódás meglehetősen kismértékű O2 fogyasztással párosul, ugyanakkor jól korrelál a szöveti glükóz-felhasználással (Edvinsson és Krause, 2002, Sándor, 2015).

Ez persze nem jelenti azt, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat során a metabolikus faktorok ne játszanának fontos szerepet a véráramlás megfelelő szintjének a fenntartásában, de mindenképpen azt sugallja, hogy a kezdeti gyors metabolikus és áramlási változások hátterében egy mind az anyagcserére, mind a keringésre igen gyorsan ható tényező, mégpedig az agyi rezisztenciaerekhez futó idegrostokon keresztül megvalósuló neuralis szabályozás áll (Edvinsson és Krause, 2002; Sándor, 2015).

1.1.2.1. Az asztrociták lehetséges szerepe a neurovaszkuláris kapcsolat szabályozásában

Az agyi funkciók fenntartása érdekében az idegi aktivitás és a lokális agyi vérátáramlás között tehát egy precízen koordinált szabályozás érhető tetten, mely mechanizmus neurovaszkuláris kapcsolat (neurovascular coupling) néven ismeretes. A neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásában az asztrocitáknak központi szerepet tulajdonítanak. Az asztrocita, strukturális nézőpontból, a központi idegrendszer domináns gliasejt típusa, mely szabályozza a szinaptikus transzmissziót és a neurovaszkuláris kapcsolatot: egyes nyúlványai szinapszisokkal vannak kapcsolatban, más nyúlványai véglábakat formálnak a kapillárisokon és arteriolákon. Ez a szoros anatómiai kapcsolat az asztrociták, a neuronok és a mikroerek között szintén arra utal, hogy az asztrociták fontos szerepet játszanak az agyi véráramlás szabályozásában (Blanco és mtsai., 2008; Nuriya és Hirase, 2016; Howarth, 2014). Vizsgálatok igazolták, hogy az idegi aktivitás során felszabaduló neurotranszmitterek elérik az asztrociták receptorait, az asztrocita intracellularis Ca²⁺ tartalma nő, melynek következtében a véglábakon felszabadulnak azok a vazoaktív anyagok, amelyek a parenchymában lévő arteriolák átmérőjét szabályozzák. A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció ATP, D-szerin, és glutamát felszabadulással jár (Muñoz és mtsai., 2015), valamint vazodilatátor anyagok szekrécióját (epoxyeicosatrien-sav, adenozin, nitrogénmonoxid) eredményezi a perivaszkuláris végtalpakból (Jakovcevic és Harder, 2007; Filosa és Blanco, 2007). Hipotézisek szerint az asztrociták modulálják, és nem kiváltják a funkcionális hiperémiát: vazoaktív vegyületek felszabadítása révén segítenek az agy mikroereinek alaptónusának fenntartásában, és így széles skálán képesek befolyásolni a metabolikus igényeknek megfelelő vérátáramlást (Rosenegger és Gordon, 2015; Filosa és mtsai., 2016). A rezisztenciaerek átmérőjének szabályozásán túl az asztrociták jelentős szerepet játszanak a neurotransmitterek felvételében és újrahasznosításában is (Figley és Stroman, 2011).

A neurovaszkuláris kapcsolat emberben történő tanulmányozása során az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a vizuális stimuláció hatására az arteria cerebri posterior területében bekövetkező vérátáramlás növekedésének a vizsgálata. A vizuális stimuláció hatására a látókéreg aktivációja révén az aktivált területet ellátó rezisztenciaerek dilatálnak, mely az adott területben a regionális vérátáramlás növekedéséhez vezet (Rosengarten és mtsai., 2002a, Rosengarten és mtsai., 2002b). Érdekes, hogy nemcsak látókban, vizuális stimulus hatására, hanem vakokban, Braille írás olvasásakor is ki tudták mutatni a látókéreg aktivációját (Sadato és mtsai., 1996) és az aktivált területben a következményes regionális vérátáramlás növekedést. A látókéreg Braille olvasásban betöltött szerepét hangsúlyozza az a megfigyelés is, mely szerint vakokban kétoldali occipitalis lebeny károsodás a Braille olvasás képességének az elvesztésével járt (Hamilton és mtsai., 2000).

1.1.2.2. A neurovaszkuláris kapcsolat humán vizsgálatának lehetőségei

Mint láttuk, a neurovaszkuláris kapcsolat egy összetett, precízen szabályozott folyamat, mely az emberi szervezetben többek között fMRI (funkcionális mágneses rezonanciás képalkotás), PET (pozitron emissziós tomographia), SPECT (single photon emissziós computer tomographia), near-infrared spektroszkópia (NIRS) és transzkraniális Doppler vizsgálat (TCD) segítségével tanulmányozható.

1.1.2.2.1. fMRI

Az fMRI alapjául szolgáló jelenséget Ogawa és munkatársai írták le először 1990-ben (Ogawa és mtsai., 1990). A funkcionális MR képalkotás (fMRI) célja az agy működésének, az agyi idegsejt csoportok aktivációjának térbeli és időbeli leképezése, mely lehetőséget ad az adott neuronális aktivitás térbeli lokalizációja, a funkció és anatómiai hely összefüggéseinek feltárására. Így a modern képalkotó diagnosztikában lehetőség van például a látásért, a beszédért és a nyelvhasználatért felelős területek, a végtagok mozgatásakor aktiválódó agyi régiók megjelenítésére egyaránt, de vizsgálhatók a fájdalom és gondolkodás során aktiválódó területek is (Aschermann és mtsai., 2015; Berényi, 2011).

A klinikai gyakorlatban elterjedt fMRI képalkotó technikák alapja az ún. BOLD ("blood oxigén level-dependent", azaz a vér oxigénszintjétől függő) kontraszt megjelenítése. Egyes feladatok elvégzésekor az aktiválódó idegsejt csoportok anyagcseréje és, a neurovaszkuláris kapcsolatnak köszönhetően, az adott régió lokális vérátáramlása is fokozódik. A megnövekedett véráramlás következtében nő az oxihemoglobin (oHb) és csökken a deoxihemoglobin (dHb) vérszintje a kapillárisokban. Ez a változás "belső" kontrasztanyagként szolgál az fMRI képalkotás során, ugyanis a dHb paramágneses tulajdonsággal bír. Ez a paramágneses hatás kiterjed az ereket övező szövetre is, lokális frekvencia eltolódást és jelcsökkenést okozva a megfelelő paraméterekkel készített T2* felvételeken. Ezáltal az aktív területek a fokozott perfúzió és a következményesen alacsony dHb szint miatt magas jelintenzitással elkülöníthetők az agy inaktív, fokozott perfúziót nem mutató, magasabb dHb tartalmú területeitől. Ezt nevezzük BOLD kontrasztnak. A változás a neuronális aktiváció után 1-2 másodperc elteltével kezdődik, s maximális hatása kb. 5 másodperc után alakul ki (Berényi, 2011).

Az fMRI során a BOLD kontraszt változása az oxigén metabolizmus, véráramlás, és vértérfogat változás eredőjeként jelenik meg, így az fMRI közvetett módon méri az agyi funkciókat. A módszer térbeli felbontása nagyon jó, különböző agyi régiók keringését tanulmányozva submilliméter pontossággal sikerült meghatározni az aktivált területeket (Fukuda és mtsai., 2016).

Az fMRI vizsgálat előnye a széleskörű alkalmazhatósága mellett az, hogy az emberi szervezetet károsító szert nem kell a szervezetbe bejuttatni a kísérleteknél, mivel a vérben található deoxihemoglobin paramágneses tulajdonságát használja. Hátránya, hogy a vizsgálat meglehetősen drága, műszerigényes, s a legkisebb mozgás is műtermékek megjelenésével jár, emiatt a vizsgálati alanyok precíz és fegyelmezett együttműködését igényli (Ogawa és mtsai., 1990; Ogawa és mtsai., 1992; Ogawa és mtsai., 1993; Ogawa és mtsai., 1998).

1.1.2.2.2. PET és SPECT

A nukleáris medicina vizsgálómódszereihez tartozó PET és SPECT vizsgálat a neurológiában leggyakrabban az agyi vérátáramlás vizsgálatát célozza. A PET vizsgálat során speciális, pozitron sugárzó vegyületeket használnak. A PET módszer hátterében az áll, hogy egyes elemek spontán bomlása során pozitronok szabadulnak fel. A kisugárzott pozitron amint egy elektronnal találkozik, az annihilációnak nevezett folyamat során megsemmisül és két azonos energiájú (511 keV-os), egymással ellentétes irányba induló gamma foton keletkezik, melyeket a vizsgált személy körül gyűrű alakban elhelyezkedő PET-scanner detektál. A pozitron bomlást produkáló elemek azonban meglehetősen instabilak, gyorsan elbomlanak, ezért ezeket a vegyületeket helyben kell előállítani. A gyakorlatban a PET vizsgálat céljaira elsősorban a ¹⁸F, ¹⁵O, ¹³N és ¹¹C izotópokat használják. Kutatási célokra a véráramlást vizsgáló tanulmányokban ezek közül is leginkább a ¹⁵O-nel jelölt H₂O használata terjedt el, amit intravénásan beadva, a lokális vérátáramlás mérhető.

A PET és fMRI közötti gyakorlati alkalmazás szempontjából az egyik lényeges különbség, hogy a PET módszernél alkalmazott jelforrások olyan instabilak (a ¹⁵O felezési ideje mindössze 2 perc), hogy ezeket a helyszínen kell előállítani, ami egy ciklotron felszerelését és kezelését, valamint az adott molekulákat előállítani képes személyzet és infrastruktúra meglétét igényli. További hátránya a PET-nek, hogy az 1 mm körüli térbeli felbontással rendelkező fMRI-nél lényegesen gyengébb a felbontása, nem beszélve a sokszorosan rosszabb időbeli felbontásról (Wienhard, 2000; Czernin és Phelps, 2005; Datz és mtsai., 1992).

A single-photon emission computer tomography (SPECT) során nem egy bomlásból származó pozitron kelti a detektálandó gamma fotonokat, hanem azok közvetlenül egy gamma sugárzó forrásból (többnyire ⁹⁹Tc vagy ¹²³I) származnak. A SPECT-nek a rossz térbeli felbontása és a felhasznált izotópok bio-inkompatibilis volta (az oxigénnel ellentétben a jód csak igen korlátozottan fordul elő a szervezetben, a technécium pedig egyáltalán nem) szab határt, ennek ellenére a SPECT sokszor mégis a PET alternatíváját jelentheti lényegesen alacsonyabb árának köszönhetően (Holman és Devous, 1992; Datz és mtsai., 1992, George, 1991).

Összességében elmondható, hogy mind az fMRI, mind a SPECT, PET költséges, műszer- és időigényes, nehezen elérhető vizsgálatok. Emellett a PET, SPECT vizsgálatok során radioizotóp beadása szükséges, így sugárterheléssel is járnak. Ezek miatt a gyakorlatban egyéb, könnyen alkalmazható, kiváló időbeli felbontással járó technikák, mint a transzkraniális Doppler vizsgálat és a near-infrared spektroszkópia (NIRS) terjedtek el a neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálatára (Zhang és mtsai., 2009; Villringer, 1997).

1.1.2.2.3. NIRS

A különböző molekularezgések gerjesztéséhez szükséges frekvenciák általában a normál infravörös tartományba (2500-25000 nm) esnek. Ennek a tartománynak az agykutatásban való alkalmazhatóságát jelentősen korlátozza, hogy a víz nagymértékben elnyeli az infravörös fényt, emiatt a detektálandó fény a szövetben elvész. Ezért terjedt el a közeli infravörös tartomány (800-2500 nm) használata, mely könnyebben penetrál a szövetekbe és elnyelődése relatíve alacsony. A keringő hemoglobin azonban az oxigenizáltságtól függően nagyobb mértékben nyeli el ezt a hullámhosszúságú fényt, emiatt a módszer segítségével következtethetünk az oxi- és deoxihemoglobin koncentráció változásaira és az összhemoglobin koncentrációra. Mivel egy adott agyterület aktivációjakor nő az aktivált területben a vértérfogat, s ezzel együtt a hemoglobin koncentráció, valamint az oxihemoglobin aránya a deoxihemoglobinhoz képest, a módszer alkalmas a neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálatára. Az infravörös spektroszkópia előnye, hogy nem invazív, külső szer bejuttatását nem igényli és a fejre helyezett fényforrás és érzékelők segítségével szabadon mozgó személyen is alkalmazható, ráadásul jóval olcsóbb, mint a PET vagy az fMRI (Zhang és mtsai., 2009).

A NIRS technika egyik hátránya azonban, hogy csak 30%-ban artériás és 70%-ban vénás szaturáció értéket mér és azt is csak a felszínhez közeli régiókban. Használhatóságát az agyi reaktivitás-vizsgálatokban ezek a tényezők jelentősen korlátozzák, különösen az általunk végzett vizuális stimuláció esetén, ahol az occipitális lebeny fölé kellene helyezni a detektort, ahonnan a mélyebben lévő látókéregről feltehetően nem lehetne érdemi információt nyerni. Hátránya továbbá, hogy viszonylag rossz a térbeli felbontása, mindemellett a nyert adatok feldolgozása alapos szakértelmet és matematikai hátteret igényel (Strangman és mtsai., 2002; Hoshi, 2007; Gagnon és mtsai., 2012).

1.1.2.2.4. Ultrahang technikák – transzkraniális Doppler

A neurovaszkuláris kapcsolat legegyszerűbben transzkraniális Doppler (TCD) vizsgálattal tanulmányozható, mellyel az agyi véráramlási sebesség kiválóan követhető a különböző intrakraniális nagyartériákban (Aaslid és mtsai., 1982; Brauer és mtsai., 1998; Baumgartner, 2006). A módszer nem invazív, olcsó, egyszerűen kivitelezhető, kiváló időbeli felbontással rendelkezik és tetszőlegesen ismételhető. Legfőbb hátránya, hogy a térbeli felbontása meglehetősen rossz, s a koponyacsont vastagsága néhány személyben, elsősorban idősebb nőkben határt szab az alkalmazásának.

Napjainkra ez a technika jelentős szerepet kapott az agyi vérkeringés vizsgálatában. Az ultrahangon alapuló vizsgálóberendezések egy, az elektromos energiát 1 és 20 MHz frekvenciájú ultrahang hullámokká alakítani képes transzducerből állnak. A transzducerben lévő piezoelektromos tulajdonsággal bíró kristályok nemcsak az ultrahang generálására, hanem a visszavert ultrahang hullámok detektálására is alkalmasak. A kibocsátott ultrahang szöveti határfelülethez érve, a szövetek akusztikus impedanciájától függően visszaverődik, vagy továbbhalad. A visszaverődő hullámokból a feldolgozástól függően képi és áramlási információk nyerhetők (Baumgartner, 2006). Mivel vizsgálatainkban az intrakraniális erekben folyó vér áramlási paramétereinek a meghatározása volt a cél, az erre alkalmas transzkraniális Doppler működési elvét ismertetjük.

Az Aaslid és munkatársai által 1982-ben kifejlesztett transzkraniális Doppler (TCD) vizsgálat lehetővé tette az intrakranialis artériákban a véráramlási sebességnek és a pulzatilitási index mérése révén a vaszkuláris rezisztenciának nem invazív módon történő meghatározását (Aaslid és mtsai., 1982; Lindegaard és mtsai., 1985; Rózsa és mtsai., 1989). A módszer az elmúlt két évtizedben óriási fejlődésen ment keresztül. Ennek köszönhetően ma már nemcsak a subarachnoidalis vérzés következtében kialakuló vazospazmus mértékének követésére és az intrakraniális arteriák stenosisainak és okklúzióinak a diagnosztizálására használják, hanem szerepet kapott a neurovaszkuláris kapcsolat, a cerebrovaszkuláris reaktivitás, a cerebrális autoreguláció, az intrakraniális nyomásváltozás vizsgálatában csakúgy, mint a cerebrális mikroembólusok kimutatásában. További fejlődést jelentett az ultrahangos kontrasztanyagok megjelenése, melynek tárgyalása meghaladja ezen értekezés kereteit.

A transzkraniális Doppler készülékek általában 2 MHz, vagy ahhoz közeli frekvenciájú ultrahang hullámot használnak, mivel ez a frekvencia képes áthatolni a koponyacsont meghatározott helyein az agyszövetbe (Aaslid és mtsai., 1982; Brauer és mtsai., 1998; Baumgartner, 2006). Az agyszövet ereiben, az áramló vörösvértestek keltette Doppler frekvencia eltolódás a kibocsátott és visszavert ultrahang hullámok frekvenciakülönbségéből kiszámítható (Aaslid és mtsai., 1982; Oláh L, 2015), melyből az alábbi képlet segítségével az áramló sejtes elemek sebessége kiszámítható:

v=df c/f₀ cos theta,

ahol v a sejtes elemek áramlási sebessége, df a Doppler frekvencia eltolódás (Doppler shift), c az ultrahang terjedési sebessége az adott közegben (ez agyszövetben 1540 cm/s), f_0 a kibocsátott ultrahang frekvenciája (esetünkben 2 MHz), míg a theta a kibocsátott ultrahang nyaláb és a véráramlás vektora által bezárt szög (ideális esetben 0 fok).

A hagyományos transzkraniális Doppler módszer képi információt nem ad, csak áramlási spektrum vehető fel. A transzducert a koponya azon helyei fölé helyezzük, ahol a csont relatíve vékony, vagy hiányzik, s így a kibocsátott ultrahang képes az intrakraniális térbe jutni. Ezeket a helyeket, ahová a transducer helyezhető, csontablakoknak hívjuk. Alapvetően 3 csontablakot különítünk el: 1) a temporalis ablak az os zygomaticum fölött van; 2) az orbitális ablakon keresztül a szemre helyezett szondával vizsgálhatunk; 3) a foramen magnumon keresztül szintén "beláthatunk" a koponya belsejébe, s elsősorban a hátsó cerebrális keringés vizsgálható ebből a pozícióból. Attól függően, hogy mely csontablakot használjuk, különböző artériákban folyó vér áramlási paraméterei vizsgálhatók. A vizsgálni kívánt ér azonosításában a csontablakon túl, a vizsgálati mélység és a detektált áramlás iránya segít. Bizonyos artériákban különböző funkcionális tesztek is használhatóak a vizsgált artéria azonosítására (pl. arteria carotis compressio esetén élettani körülmények között az ipsilateralis arteria cerebri anterior A1 szakaszában megfordul az áramlás iránya, míg a contralateralis arteria cerebri anteriorban nő az áramlási sebesség; az arteria cerebri posteriorban szemnyitásra fokozódik, szemcsukásra csökken az érben folyó vér áramlási sebessége). A vizsgálathoz természetesen elengedhetetlen az agy vaszkuláris anatómiájának ismerete (Baumgartner, 2006; Guan és mtsai., 2013).

Transztemporális vizsgálat esetén az arteria cerebri media főtörzse 45-60 mm mélységben található, elágazása kb. 40-45 mm mélységben van. Az arteria carotis interna disztális szakaszának elágazása 60-65 mm-re található. Az arteria cerebri media vonalába esik, csak mélyebben, 65-70 mm között detektálható az arteria cerebri anterior A1-es szakasza. Az arteria carotis interna elágazásától kissé hátrább, kb. 60-70 mm mélységben, kissé occipitalis irányba fordított szondával érhetjük el az arteria cerebri posterior (PCA) P1es részét, míg még hátrébb fordítva a szondát, a PCA a. communicans posterior ág utáni P2-es szakasza, illetve az ebben az érszakaszban detektálható áramlás tanulmányozható 58-60 mm mélységben. Transzorbitális vizsgálattal az arteria ophthalmica és az arteria carotis interna pars cavernosa része (C2-C4 szakasz) vizsgálható 40, illetve 70 mm mélységben. Megjegyzendő, hogy transzorbitális vizsgálat során az ultrahang biológiai hatása miatt az ultrahang intenzitása 17 mW/cm², a mechanikai index 0.28 alá állítandó és a vizsgálati idő a lehető legrövidebbre csökkentendő. A transzforaminális vizsgálattal az arteria vertebralis V4 szakasza 36-60 mm, illetve az arteria basilaris 75-100 mm mélyen vizsgálható (Baumgartner, 2006; Pánczél, 2015). Az MCA spektruma pozitív (transzducer felé irányuló áramlás), az ACA-ban folyó vér áramlási iránya negatív (a transzducertől távolodó áramlás), a PCA P1 szakaszán az áramlási spektrum pozitív, a P2 szakaszán viszont negatív, mivel a mesencephalon körül hátrakanyarodik az ér (3. ábra).



3. ábra Az intrakraniális nagyerek MR angiográfiás képe. Jól látható, hogy a PCA P1-es szakasza előre és lateralis, P2 szakasza hátra és lateralis, majd hátra és mediális irányba halad. Rövidítések: ACA: arteria cerebri anterior; MCA: arteria cerebri media; PCA: arteria cerebri posterior; PCoA: arteria communicans posterior. A PCA P1 a PCA PCoA előtti, a PCA P2 a PCA PCoA utáni részét jelzi. (A Stanford University Orvostudományi Központ felvétele alapján, módosítva. https://web.stanford.edu/dept/radiology/radiologysite/site510.html)

Az agy bazális ereiben a véráramlás sebessége TCD-vel mérhető, s az áramlási sebességből következtethetünk egy esetleges stenosis, vagy vazospazmus mértékére. Mégis, a mindennapi gyakorlatban a TCD-t elsődlegesen nem az intrakraniális artériás szűkületek meghatározására használják, hanem a TCD fő alkalmazási területeit a cerebrovaszkuláris rezervkapacitás mérése, az emboliadetektálás és a tudományos vizsgálatok képezik (Barzó és mtsai., 1992; Barzó és mtsai., 1996; Aaslid, 2006; Wolf, 2015).

A funkcionális TCD vizsgálatok ismertetése előtt meg kell jegyezni, hogy az artériás szűkület kivételével az áramlási sebességet befolyásoló érátmérő változások nem az artéria kezdeti szakaszán, hanem a rezisztenciaerek (arteriolák) szintjében jelentkeznek (**4. ábra**). Világosan kell tehát látni, hogy míg az áramlási sebességet az intrakraniális artériák főtörzsében mérjük, addig a neuronális aktiváció, a különböző endogén, vagy exogén kémiai ágensek, illetve a vérnyomásváltozás hatására jelentkező érátmérő változások a rezisztenciaerekben (mikroerekben), s nem a nagyartériákban történnek (Aaslid, 1982; Aaslid, 2006; Baumgartner, 2006; Fernández-Klett és mtsai., 2010). A rezisztenciaerek dilatációja következtében az érellenállás csökken, míg a mikroerek konstrikciója az érellenállás növekedését eredményezi. Így, a vazodilatáció a vaszkuláris rezisztencia csökkenése által az áramlás és így a konstans átmérőjű artériás főtörzsben az áramlási sebesség növekedését eredményezi, míg a vazokonstrikció a vaszkuláris rezisztencia növekedésén keresztül az

áramlás és az artériás főtörzsben az áramlási sebesség csökkenését okozza (**4. ábra**). Az áramlási sebesség mellett értékes, indirekt információt szolgáltat a TCD vizsgálat a rezisztenciaerek ellenállásáról. Ez, az ellenállásra utaló paraméter az úgynevezett pulzatilitási index, melyet a szisztolés és diasztolés sebesség különbsége és az átlagos áramlási sebesség hányadosaként definiálunk (Lindegaard és mtsai., 1985; Rózsa és mtsai., 1989)



4. ábra Míg a TCD mérések az intrakraniális nagyartériákban (általában arteria cerebri mediában /MCA/, vagy arteria cerebri posteriorban /PCA/) történnek, fontos tudni, hogy a vazoaktív stimulusok hatása a mikroerek szintjén érvényesül.

Tudni kell, hogy az áramlási sebesség különböző személyekben nem arányos a véráramlással, hisz különböző személyekben más lehet a vizsgált artéria átmérője és mások lehetnek a véráramlást befolyásoló egyéb tényezők is (vérnyomás, pCO₂, viszkozitás...). Ugyanakkor, egy személyen belül már az artériás főtörzsben mért áramlási sebesség változása arányos az adott ér ellátási területében bekövetkező áramlásváltozással. Ezt igazolták TCDvel és SPECT-tel végzett összehasonlító vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy ugyanabban a személyben a TCD-vel mért véráramlási sebesség változás és a SPECT-tel detektált vérátáramlás változás egymással jól korrelálnak (George, 1991, Holman és Devous, 1992; Datz és mtsai., 1992, Pávics és mtsai., 1994). Mindez azonban csak akkor igaz, ha a vérátáramlás változását kiváltó stimulus nem befolyásolja számottevően a vizsgált ér keresztmetszetét (Rasulo és mtsai., 2008). Általánosságban elmondható, hogy a vazoaktív stimulusok hatásukat a kis átmérőjű rezisztenciaereken fejtik ki, míg a vizsgált intrakraniális nagyartériák átmérőjét nem, vagy csak sokkal kisebb mértékben befolyásolják (Sorteberg, 1992; Giller és mtsai., 1993; Schreiber és mtsai., 2000). Ezek alapján az intrakraniális nagyartériákban detektált áramlási sebesség változásából következtetni lehet az adott artéria által ellátott agyszövetben bekövetkező vérátáramlás változás mértékére.

Azért, hogy a különböző személyekben bekövetkező áramlási sebességváltozásokat egymással összehasonlíthassuk, relatív sebességeket számolunk. Ennek során az adott

stimulust követően mért áramlási sebességeket és a stimulusra bekövetkező áramlási sebességváltozást a nyugalmi, stimulus előtti sebességérték százalékában fejezzük ki, mely így már lehetőséget ad a különböző egyénekben bekövetkező változások összehasonlítására. Ahhoz, hogy az artériás főtörzsben mérhető sebességet tartósan és megbízhatóan monitorozzuk, s az esetleges TCD transzducer elmozdulás ne befolyásolja a méréseket, fontos, hogy a TCD szonda mindig ugyanabban a pozícióban maradjon. Ezt biztosítja a TCD szonda rögzítésére alkalmas fejpánt, mely precízen képes a TCD monitorozó 2 MHz-es szondát mindkét oldalon rögzíteni (**5. ábra**).



5. ábra A funkcionális TCD (fTCD) vizsgálatok során az intrakraniális nagyartériákban az áramlási paraméterek folyamatos és tartós monitorozását a rögzíthető monitorozó TCD szondák teszik lehetővé, melyek állítható fejpánt segítségével tetszőleges helyzetben stabilan felhelyezhetők.

A klinikai gyakorlatban számos cerebrovaszkuláris kórképben (pl. stroke, intrakraniális artéria stenosis, vazospazmus, subarachnoidalis vérzés, sarlósejtes vérszegénység) diagnosztikai eszközként használatos a TCD, de vizsgálható az agyat ellátó nyaki artériák obstrukciójának a cerebrális hemodinamikai következménye, illetve az intrakraniális nyomásnövekedés agyi keringésre gyakorolt hatása és az agyhalál is (Leányvári és mtsai., 2002, Aaslid, 2006; Rasulo és mtsai., 2008; Purkayastha és Sorond, 2012; Topcuoglu, 2012, Naqvi és mtsai., 2013; Kalanuria és mtsi., 2013). A cerebrovaszkuláris rezervkapacitás és a mikroembolia detektálás carotis stenosis esetén hasznosak a stroke rizikó előrejelzésében, s az intervenciós és érsebészeti beavatkozások indikációjának felállításában és megtervezésében (Silvestrini és mtsai., 2000; Aaslid, 2006, Settakis és mtsai., 2002; Settakis és mtsai., 2003; Vastagh és mtsai., 2008). További terápiás lehetőség a trombolízis potencírozása, illetve a gyógyszeres terápiák követése (Barlinn és Alexandrov, 2013).

A transzkraniális Doppler (TCD) az egyetlen olyan vizsgálómódszer, amivel az agyalapi erek monitorozása során a keringő gáz- illetve szolid mikroembolusokat (MES) észlelni lehet. Általában ezek a mikroembolusok klinikailag nem okoznak tüneteket, azonban meglétük tünetmentes betegeknél fokozott stroke-rizikóra utalhat (Markus és mtsai., 2010). Egészséges személyekben MES nem detektálható, de előfordulhat instabil carotis plaque esetén, műbillentyűs betegekben, nem megfelelően anticoagulált pitvarfibrillatiós egyénekben, illetve akkor is, ha egyéb okok miatt a szívben trombus képződik (Droste és Ringelstein, 1998). Az agyi vérátáramlásra gyakorolt eltérő stimulusok hatására létrejött véráramlási sebesség változás monitorozását **funkcionális transzkraniális Doppler (fTCD)** módszernek nevezzük. A módszer többek között alkalmas az acetazolamid provokáció (Settakis és mtsai., 2003), a CO₂ inhaláció, az apnoe teszt és a hiperventiláció (Settakis és mtsai., 2002) hatására létrejövő sebességváltozás monitorozására (vazoreaktivitás). Emellett a fTCD az ortosztatikus reakció (Azevedo és mtsai., 2007; Viski és mtsai., 2016) és az egyéb okból bekövetkező vérnyomásváltozás következtében kialakuló áramlási sebességváltozás követésére (agyi autoreguláció) (Aaslid, 2006), valamint a vizuális és kognitív stimuláció révén létrejövő véráramlási sebesség változásoknak a vizsgálatára (neurovaszkuláris kapcsolat) (Rosengarten és mtsai., 2007; Oláh és mtsai., 2008) is használatos.

Carotis szűkület esetében akár standard időtartamú (30 mp) vagy hosszabb légzésvisszatartás után, akár acetazolamid, vagy szén-dioxid adás során mindkét oldalon monitorozható az agyi erek áramlási sebességváltozása. Az említett stimulusokra jelentkező agyi erekben mérhető áramlási sebességváltozás időbeli lefolyása az úgynevezett cerebrovaszkuláris reaktivitás. A fenti ingerek hatására egészséges személyben az arteriolák tágulnak, a vaszkuláris rezisztencia csökken, s ennek következtében az agyi vérátáramlás és következményesen az intrakranialis nagyartériákban az áramlási sebesség nő. A cerebrovaszkuláris reaktivitás kiszámítására a következő képlet használható (Silvestrini és mtsai., 2000; Settakis és mtsai., 2002; Settakis és mtsai., 2003):

CR=100 (v₁-v₀)/v₀,

ahol v₀ a nyugalmi áramlási sebesség, v₁ a stimuláció (lélegzetvisszatartás, CO₂, acetazolamid) alkalmazása utáni áramlási sebesség. A reaktivitás azt mutatja meg, hogy az adott stimulus milyen mértékű (hány százalékos) áramlásváltozást idézett elő az adott artéria területében a mérési időpontban.

A cerebrovaszkuláris rezervkapacitás nem más, mint a cerebrovaszkuláris reaktivitás maximális értéke:

CRC=100 (v_{max}-v₀)/v₀,

ahol v_0 a nyugalmi áramlási sebesség, v_{max} a stimuláció hatására kialakuló maximális áramlási sebesség.

Az apnoe teszt során szokás az apnoe időtartamára standardizált értéket is megadni:

CRC (apnoe) = $[100 (v_{max}-v_0)/v_0]/t$,

ahol v0 a nyugalmi áramlási sebesség, vmax a lélegzetvisszatartás hatására kialakuló maximális áramlási sebesség, t a lélegzetvisszatartás időtartama.

A normális mértékű CRC 30% fölött van. Ennél kisebb sebességnövekedés csökkent, a 10% alatti változás kimerült CRC-t jelez. Ez arra utal, hogy vagy gátolt az adott ér ellátási területében a rezisztenciaerek dilatációja, vagy már a stimulus alkalmazása előtt kitágultak a rezisztenciaerek, s ezért a további vazodilatatív inger már nem, vagy csak csökkent mértékű vazodilatációt tud előidézni. Ennek jó példája az a súlyos carotis stenosisban szenvedő beteg esete, akiben a súlyos carotis interna stenosis miatt a csökkent perfúziós nyomás hatására tágulnak az arteriolák, s így egy további vazodilatatív inger már csak mérsékelt vazodilatációt tud létrehozni a rezisztenciaerekben, vagyis csökkent lesz a cerebrovaszkuláris rezervkapacitás. Ez azt jelzi, hogy a beteg a csökkent perfúziós nyomás esetén életbe lépő kompenzatorikus lehetőségeket már, legalábbis részben, kihasználta, s egy további perfúziós nyomáscsökkenés esetén fokozott lehet a kritikus perfúziócsökkenés és így a stroke rizikója (Silvestrini és mtsai., 2000; Settakis és mtsai., 2003).

Fokozott intrakraniális nyomás mérésekor a pulzatilitási index jól követi az intrakraniális nyomás változását. Az intrakraniális nyomás növekedése esetén a diastolés sebesség gyorsabban csökken, mint a szisztolés, ami a PI markáns növekedését eredményezi (Robba és mtsai., 2016).

A TCD agyhalál megállapításában is kiegészítő módszer lehet, ha ugyanis 30 perc különbséggel végzett két TCD vizsgálat során nem találunk megfelelő agyi keringést olyan helyen és szögben vizsgálva, ahol korábban észlelhető volt, írásos leletbe foglalva megfelel az agyhalál egyik képalkotó eszközös bizonyítására. Ilyen esetekben vagy nem találunk áramlást, vagy az extrém módon megnőtt vaszkuláris rezisztenciára utaló systolés tüskéket, illetve ingaáramlást észlelünk (Rasulo és mtsai., 2008; Naqui és mtsai., 2013; Kalanuria és mtsai, 2013).

A neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálata során az alkalmazott stimulustól és így az aktivált területtől függően az artéria cerebri media (beszédközpont, mozgatókéreg stimulációja) vagy az artéria cerebri posterior (látókéreg stimuláció esetén) véráramlási sebességét mérhetjük. Tanulmányainkban a vizuális aktiváció hatására az arteria cerebri posteriorban folyó vér áramlási sebesség változását vizsgáltuk. A vizuális stimuláció (olvasás) hatására a látókéreg aktiválódik, így a neuronális aktiváció következményeként az aktivált területet ellátó rezisztenciaerek dilatálnak, mely az adott területet ellátó intrakraniális artériában az áramlási sebesség növekedéséhez vezet. Ez az áramlási sebességváltozás jól detektálható transzkraniális Dopplerrel (Pánczél és mtsai., 1999; Rosengarten és mtsai., 2002; Rosengarten és mtsai., 2003a; Oláh és mtsai., 2008). Nagy előnye a vizsgálatnak, hogy különösebb előkészület nélkül tetszőleges időpontban ismételhető és külső ágens beadását nem igényli. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a neuronális aktivitás kiváltotta áramlási sebességnövekedés mértéke az agyi erek funkciójának és károsodásának érzékeny markere (Rosengarten és mtsai., 2003b; Rosengarten és mtsai., 2006, Rosengarten és mtsai., 2007; Oláh és mtsai., 2008).

Meg kell még említenünk az ortosztatikus reakció kiváltotta áramlási sebességváltozásokat. A vizsgálathoz általában dönthető asztalt használunk, melyre a vizsgált személyt rögzítjük. Először vízszintes helyzetben mérjük meg a nyugalmi hemodinamikai paramétereket (pulzus, vérnyomás, arteria cerebri mediában mért áramlási sebesség), majd az asztalt 60-80 fokos szögben felállítjuk. Egészséges személyben rövid ideig tartó, átmeneti vérnyomásesés után a vérnyomás stabilizálódik, eléri a felállítás előtti értéket, vagy még emelkedik is. Ennek hátterében a fiziológiás baroreceptor reflex hatására megjelenő kompenzatorikus tachycardia és a perifériás rezisztenciaerek konstrikciója következtében kompenzatorikus negnőtt perifériás vaszkuláris rezisztencia áll (Smith és Ebert, 1990). Az ortosztatikus reakciót számos, a vegetatív idegrendszert érintő betegség (polyneuropathia, diabetes mellitus), illetve exogén ágens (alkohol, vazodilatációt kiváltó gyógyszerek, szívfrekvencia fokozódást gátló szerek) károsíthatja (Viski és mtsai., 2016).

1.2. A CEREBRÁLIS ISCHAEMIA PATOFIZIOLÓGIÁJA

1.2.1. A cerebrális ischaemia fogalma. Az agyi anasztomózis rendszerek

A cerebralis ischaemia az agyi vérátáramlás csökkenését jelenti, melynek hátterében az agyat ellátó erek szűkülete, vagy elzáródása áll. Az agyat közvetlenül mindkét oldalon 3 ér, az a. cerebri anterior, a. cerebri media és az a. cerebri posterior látja el, melyek két nagy kollaterális rendszeren keresztül állnak kapcsolatban egymással. A fenti arteriák eredését a Willis kör köti össze (**6. ábra**), míg a disztális kortikális ágak kapcsolatát a Heubner féle leptomeningealis hálózat biztosítja (Alpers és mtsai., 1959; Zülch, 1985; Liebeskind, 2003). A Willis kör az extrakraniális, agyi eret ellátó a. carotis interna és a. vertebralis szűkülete, vagy okklúziója esetén képes a csökkent vérellátás kompenzációjára, míg a leptomeningealis anasztomózisok a Willis kör utáni arteriák (a. cerebri anterior, a. cerebri media és az a. cerebri posterior) szűkülete, vagy elzáródása esetén tudja mérsékelni az ischaemia súlyosságát. A fenti anasztomózisok egyéni variabilitása magyarázza azt a tényt, hogy ugyanannak az agyat ellátó érnek az elzáródása egyesekben kicsiny, míg másokban az elzáródott ér teljes ellátási területére kiterjedő ischaemiás léziót eredményez (Zülch, 1985).



6. ábra A Willis kör. Az ábra jól mutatja, hogy a két arteria carotis interna rendszere, vagyis a két oldal közötti összeköttetést az arteria communicans anterior, míg a hátulsó és elülső keringési rendszer közötti kapcsolatot a két arteria communicans posterior biztosítja. (http://www.78stepshealth.us/magnetic-resonance-2/clinical-indicationsbackground.html)

1.2.2. Az agyi perfúziócsökkenés esetén életbe lépő kompenzatorikus mechanizmusok

Amikor a kollaterális rendszer az elzáródott ér ellátási területében már nem képes a normális perfúziós nyomást fenntartani, az agyi vérellátást szabályozó egyéb mechanizmusok lépnek életbe. A csökkent perfúziós nyomás következtében elsőként az agyi rezisztenciaerek, elsősorban az arteriolák, tágulnak, s ezáltal az adott terület vérellátása még normális maradhat (ez az úgynevezett agyi autoreguláció jelensége) (Dirnagl és Pulsinelli, 1990, Barzó és mtsai., 1993). Amikor a fent említett rezisztenciaerek már maximálisan dilatáltak, akkor az adott területben a véráramlás passzívan követi a perfúziós nyomás változásait. Az oxigén extrakció növelése révén az agyszövet azonban még ekkor is képes lehet a megfelelő oxigén ellátást fenntartani (Derdeyn és mtsai., 2002). Amennyiben a fenti kompenzatorikus lehetőségek kimerülnek, s az agyszövet perfúziója tovább romlik, ischaemiás-hipoxiás sejtkárosodás alakul ki. Az agyi perfúzió csökkenése circulus vitiosusként további véráramláscsökkenést okoz a mikrocirkuláció károsodása révén. Ennek hátterében a csökkent perfúzió és ischaemia miatt a vér alakos elemeinek aggregatioja és a vér viszkozitásának a lokális emelkedése, az ischaemiás károsodást szenvedett asztrociták duzzanata okozta kapilláris lumen kompressziója és a fehérvérsejtek érfalhoz történő adhéziója áll (Leniger-Follert és Lübbers, 1977; Mies és mtsai., 1983).

1.2.3. A hipoxia/ischaemia okozta funkcionális és strukturális károsodás – a penumbra koncepció

Jól ismert tény, hogy az agy a testtömeg 2%-a, mégis az agy energiafelhasználása az egész szervezet energiafelhasználásának kb. 20%-át teszi ki. Ismert az is, hogy az emlős agy döntően a glükóz oxidatív lebontásából nyeri az energiát. Elsőként Opitz és Schneider (1950) hívták fel a figyelmet arra, hogy a hipoxia/ischaemia következtében kialakult károsodás egy adott sorrend szerint történik: elsőként az agy funkcionális aktivitása szenved zavart, s csak súlyosabb hipoxia/ischaemia esetén alakul ki strukturális károsodás. Ez a jelenség, mely szerint különböző mértékű hipoxia/ischaemia következtében alakul ki a funkcionális és a strukturális károsodás, vezetett az úgynevezett penumbra koncepcióhoz. Opitz és Schneider felvetését 1977-ben Symon és mtsai. megerősítették. Ők fokális cerebrális ischaemiás modellben azt találták, hogy az EEG és a kiváltott válasz jelek, mint a funkcionális aktivitás jelzői, már enyhébb fokális vérátáramlás csökkenés esetén is károsodnak, míg a strukturális eltérésre utaló, a sejtmembrán két oldala között fennálló iongradiens megszűnése csak súlyosabb ischaemia során alakul ki (Symon és mtsai., 1977). Mivel az iongradiens a sejtek életképességének a jelzője, Symon és mtsai. azt a következtetést vonták le, hogy enyheközepes fokális agyi véráramlás-csökkenés úgy vezet funkcionális károsodáshoz, hogy a szöveti struktúra még ép marad, míg súlyos véráramlás-csökkenés már strukturális károsodást is okoz, vagyis nekrózishoz vezet. Más szóval, az elhalt, nekrotikus szövet és az egészséges agyszövet között egy funkcionálisan károsodott, de strukturálisan még ép agyszövet helyezkedik el, melyet a holdfogyatkozás mintájára a komplett árnyék (umbra) körül megfigyelhető részlegesen megvilágított terület (penumbra) alapján penumbrának neveztek el (Astrup és mtsai., 1981). Hakim 1987-ben különböző időtartamú MCA okklúziót követő reperfúziós állatmodellben azt találta, hogy a penumbra rovására írható funkcionális károsodás teljes mértékben reverzibilis, azonban hangsúlyozta, hogy a reverzibilisen és irreverzibilisen károsodott terület aránya nagyban függ az ischaemia időtartamától (Hakim, 1987). A fokális cerebralis ischaemia penumbra koncepciója a stroke patofiziológiája szempontjából alapvető, ugyanis ez alapján magyarázható az ischaemiás károsodás időbeni progressziója és érthetők meg a reperfúzió hatására visszafejlődő stroke tünetek (Hossmann, 1994b, Heiss, 2000, Ginsberg, 2003, Fisher, 2004).

dc_1398_17

A penumbra méretének vizsgálata során a kutatók különböző paraméterek alapján definiálták a penumbrát (Memezawa és mtsai., 1992; Schlaug és mtsai., 1999; Heiss, 2000), de az összes meghatározás alapját az képezte, hogy a penumbra egy csökkent vérellátású, de még életképes terület. Mivel az agyszövet életképessége az energiaigényes metabolikus folyamatok fenntartását, vagyis az ATP termelést feltételezi, Hossmann (1994b) a penumbrát a csökkent vérellátású, de megtartott energia metabolizmussal bíró agyszövetként definiálta.

1.2.4. A különböző súlyosságú ischaemia mellett kialakuló sejtszintű változások

A vaszkuláris okklúzió első óráiban az agyi vérátáramlás-csökkenés mértékétől függően különböző sejtfunkciók károsodnak (Heiss, 1992; Hossmann 1994b). A legérzékenyebb paraméter, mely már mérsékelt vérátáramlás-csökkenés mellett is károsodik, a protein szintézis. A fehérje szintézis mintegy 50%-os csökkenését már 55 mL/100g/perc, a fehérje szintézis teljes gátlását 35 mL/100g/perc áramlási érték mellett figyelték meg. A vérátáramlás további csökkenése esetén, mintegy 25-35 mL/100g/perc értéknél a glükóz felhasználás nő, ezzel párhuzamosan a laktát szint emelkedik és enyhe acidózis alakul ki. Az ischaemia súlyosbodásával, kb. 25 mL/100g/perc érték alatt a glükóz felhasználás gyorsan csökken, a szöveti acidózis kifejezetté válik, s 20-25 mL/100g/perc értéknél az ATP szint meredeken csökken. Az anoxiás depolarizációt, vagyis a sejtmembrán károsodását még súlyosabb ischaemia esetén írták le: 15 mL/100g/perc áramlási érték alatt az extracelluláris kálium szint nő, a kálcium szint a kálcium csatornák megnyílásának köszönhetően csökken (Schuier és Hossmann, 1980; Paschen és mtsai., 1992; Shimada és mtsai., 1993). A fenti folyamatok a vérátáramlás-csökkenés függvényében a **7. ábrán** láthatók.



7. ábra Az ischaemia mértékétől függően az alábbi változások következnek be a sejtfunkciókban: elsőként, mintegy 55 mL/100g/perc véráramlási értéknél (CBF) a fehérje szintézis csökken, kb. 35 mL/100 g/perc érték mellett a glükóz lebontása az anaerob glükolízis útvonalra terelődik, 20 mL/100g/perc érték alatt az energiametabolizmus károsodik, s 15 mL/100g/perc érték alatt a sejtmembrán strukturális károsodását jelző anoxiás depolarizáció alakul ki. Figyelemre méltó, hogy az energiametabolizmus károsodásáért felelős ischaemia mértéke lényegesen súlyosabb, mint ami a protein szintézis csökkenését okozza.

Az agy funkcionális aktivitását illetően az EEG és a kiváltott válasz amplitudók 25 mL/100g/perc érték alatt csökkennek, s 15 mL/100g/perc érték alatt kialszanak. Ezek az értékek az energiametabolizmus károsodásához vezető vérátáramlási szintek körül vannak, de egyértelműen a protein szintézis károsodását kiváltó ischaemiás érték alattiak, sőt még az

anaerob glükolízishez vezető ischaemiánál is valamivel súlyosabbak (Schuier és Hossmann, 1980; Paschen és mtsai., 1992; Shimada és mtsai., 1993).

A fokális cerebralis ischaemia kiváltotta metabolikus változások következtében nő a sejt ozmolalitása, ennek megfelelően víz áramlik az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, mely az intracelluláris térfogat növekedését és az extracelluláris tér csökkenését eredményezi anélkül, hogy az agyszövet nettó víztartalma nőne. Ez a változás jól vizsgálható a diffúzió súlyozott MR technikával (DWI), mely az intra- és extracelluláris térfogat változásaira érzékeny. [A különböző grádiens paraméterekkel készített DWI felvételekből ADC érték (apparent diffusion coefficient) számítható, s bár az ADC változás pontos háttere máig nem ismert (Dóczi és Schwarz, 2003), széleskörben elfogadott, hogy az ADC a vízmolekulák diffúziós sajátosságait jelzi.] Két órás fokális cerebrális ischaemiát követően azt találták, hogy a diffúzió súlyozott felvételen a szignál-intenzitás 41 mL/100 g/perc érték körül kezd emelkedni (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). Ez az áramlási küszöbérték egyértelműen magasabb, mint az az érték, melynél az agyödéma megjelenik (10 mL/100g/perc). Az agyödéma kialakulásakor a károsodott agyszövet víztartalma nő, s az az áramlási küszöb, melynél ez bekövetkezik, az anoxiás károsodáshoz szükséges értékhez hasonló (Schuier és Hossmann, 1980; Paschen és mtsai., 1992; Shimada és mtsai., 1993). Az agyszövet víztartalma T2 súlyozott MR vizsgálattal jól követhető. A fentiekből érthető, hogy ischaemiás stroke-ban a diffúzió súlyozott MR felvétel sokkal érzékenyebb, mint a T2 súlyozott felvétel.

Fontos megjegyezni, hogy az előzőekben említett vérátáramlási értékek egy adott, néhány órán (1-3 óra) át tartó ischaemia esetén érvényesek. Az infarktus kialakulását vizsgáló tanulmányok azt jelezték, hogy a fenti küszöbértékeket az ischaemia időtartama lényegesen befolyásolhatja. Az energiametabolizmus károsodása, vagyis az ATP depléció 30 perc a. cerebri media okklúzió esetén 13 mL/100g/perc ischaemiás értéknél alakul ki, míg ez az érték 2, 6 és 12 órás okklúzió időtartamnál már 19, 23, 32 mL/100g/perc értéknél jelentkezik (Mies és mtsai., 1991; Kohno és mtsai., 1995). Ez azt jelenti, hogy tartósabban fennálló permanens ischaemia esetén enyhébb fokú ischaemia is elegendő az energiametabolizmus károsodásának a kialakuláshoz. Az energiametabolizmussal szemben azonban a protein szintézis zavaráért felelős vérátáramlás-csökkenés 12 órán belüli fokális ischaemia esetén független az ischaemia időtartamától, s ez az érték 55 mL/100g/perc körül van (Hossmann, 2006).

1.2.5. A penumbra vizualizálása

A fentiekből érthető, hogy az ischaemiás stroke kezelése során a már irreverzibilisen károsodott agyszövet megmentésére nincs remény, ezért a terápiás próbálkozások a még életképes penumbra funkciójának a visszaállítását célozzák. Ez a tény a penumbra méretének meghatározására irányuló kutatásokat ösztönözte. Experimentális körülmények között a már irreverzibilisen károsodott ischaemiás magot (core) a gátolt energiametabolizmussal jellemezhető, ATP-t nem tartalmazó agyszövetként, míg a penumbrát a még ATP-t tartalmazó, megtartott energiametabolizmussal bíró, tehát életképes, de már a csökkent vérellátásra utaló metabolikus eltéréseket mutató szövetként definiálják. Mint a fent leírtakból kiderül, az energiametabolizmust még nem károsító, de már az agyszövet funkcionális károsodását előidéző áramlási értékeken a protein szintézis károsodik, s laktát-acidosis alakul ki. A fentiek alapján állatkísérletekben a penumbrát a csökkent protein szintézisű vagy

csökkent pH-jú (csökkent áramlás) terület és az ATP hiányos terület különbségeként (**8. ábra**) definiáljuk (Mies és mtsai., 1991; Bereczki és Csiba, 1993; Hata és mtsai., 1998). /Megjegyzendő, hogy mechanikus vaszkuláris okklúziós modellben a rövid időtartamú átmeneti fokális cerebrális ischaemia során az ischaemia idején ATP depléciót mutató régióban, vagyis az ischaemiás magban is rendeződhet az energiametabolizmus a korai reperfúziós fázisában, de a reperfúzió későbbi szakaszában az energiastátusz másodlagos károsodása jelentkezik (Hata és mtsai., 2000). Ezen megfigyelés alapján felmerül, hogy rövid időtartamú átmeneti ischaemiában az ischaemia idején kialakult ATP hiány valóban irreverzibilis károsodást jelez-e./



8. ábra A csökkent vérellátású, ischaemiás területben (A) az ischaemia súlyosságától és időtartamától függően két különböző szövet különíthető el a kimenetel alapján (B). A csökkent energiametabolizmussal jellemezhető szövet már irreverzibilisen károsodott (ischaemiás mag), míg a környező szövet az ischaemiás régióban funkcionálisan károsodott, de még életképes (penumbra). A penumbra az ischaemiás terület és az irreverzibilisen károsodott ischaemiás mag különbségeként definiálható (C).

Természetesen nem-invazív módszereket is kifejlesztettek a penumbra meghatározására. A legszélesebb körben a diffúziós és perfúziós MR módszerek használatosak (Schlaug és mtsai., 1999), melynek során a penumbrát az ischaemiás magot jelölő diffúzió-súlyozott felvételen látható szignál intenzitás emelkedés és a perfúzió súlyozott felvételen ábrázolódó csökkent vérátáramlású terület különbségeként definiálták. Ennek a módszernek a precíz alkalmazhatóságát azonban megkérdőjelezi az a tény, miszerint az akut fokális cerebrális ischaemia első néhány órájában a diffúzió-súlyozott felvételen látható eltérések nagyobbak voltak, mint a hisztológiai módszerekkel meghatározott, irreverzibilisen károsodott ischaemiás mag (Quast és mtsai., 1993) és mások is azt találták, hogy a diffúziósúlyozott felvételeken megjelenő szignál intenzitás emelkedés beterjedt a penumbra területébe is (Kohno és mtsai., 1995).

Kvantitatív ADC (apparent diffusion coefficient) térképek használatával már precízebb penumbra becslésre nyílik mód, mivel a 77 és 90% közötti ADC értékek jó korrelációt mutattak a biokémiai módszerekkel meghatározott penumbrával (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995) 2 óra MCA okklúziót követően. Széles körben használatos a PET (pozitron emissziós tomográfia) vizsgálat is, melynek során a fokozott oxigén extrakciós koefficienst, vagy a csökkent vérátáramlás és a szövetek életképességét jelző marker (pl. flumazenil kötődés a benzodiazepin receptorokhoz) által demarkált terület különbségét használják a penumbra kimutatására (Heiss, 2000).

1.2.6. Az ischaemiás károsodás progressziója

A nem-invazív technikák fejlődésével egyértelmű bizonyítást nyert, hogy az agyi infarktus (ischaemiás mag) növekszik. Az infarktus növekedésének hátterében nem az ischaemia progressziója áll, hisz a kollaterális keringésnek, vagy a spontán trombolízisnek köszönhetően a véráramlás az ischaemia kialakulása utáni időszakban az esetek döntő többségében már nem csökken tovább, hanem javul. Az infarktus progressziója 3 szakaszra osztható. Elsőként az ischaemia utáni néhány percben a szöveti károsodás az ischaemia következtében kialakuló energiatermelés károsodása és a következményes sejtmembrán depolarizáció miatt alakul ki. Ezt követően az ischaemia utáni 1-6 órában az ischaemiás mag a penumbra rovására növekszik, vagyis elfoglalja a penumbra területét, s végül, a károsodás késői fázisában, mely napokig tarthat, másodlagos folyamatok, mint az ödéma, gyulladás, vagy a programozott sejthalál (apoptosis) okozhat további szöveti károsodást, progressziót (Nagy és mtsai., 2002; Hossmann, 2006). A fentiek közül az infarktus legnagyobb mértékű növekedése a második fázisban következik be, vagyis amikor az ischaemiás mag elfoglalja a penumbra területét. Multiparametrikus képalkotó technikák használatával igazolták, hogy 1 órával az a. cerebri media okklúzió indukálta ischaemia kialakulása után a penumbra térfogata az ischaemiás régió kb. 1/3-a (Hata és mtsai., 2000), de három óra elteltével a penumbra térfogata már a felére zsugorodik, 6-8 óra elteltével pedig teljesen eltűnik, köszönhetően az ischaemiás mag növekedésének.

1.2.7. Az ischaemiás károsodás progressziójáért felelős tényezők

1.2.7.1. Spreading depression-szerű depolarizáció

Az ischaemiás mag penumbrába terjedésének legelfogadottabb teóriája a peri-infarktus régióban keletkező spreading-depression-szerű depolarizáció. Először 1986-ban írták le (Nedergaard és Astrup, 1986) az ischaemiás magból kiinduló, s az ischaemiás régió perifériás része felé terjedő depolarizációt. A tovaterjedő depolarizáció során a sejtbe jutó nátrium kipumpálásához a Na-K-ATP-áz fokozott működése szükséges, mely egy meglehetősen energiaigényes, fokozott oxigén és glükóz szükséglettel járó folyamat. Az egészséges agyszövetben ezt a megnövekedett energiaigényt, s oxigén és glükóz szükségletet a vérátáramlás jelentős, kb. kétszeres emelkedése biztosítja (Hossmann, 1996). Ez az áramlásnövekedés azonban a penumbra régiójában pont az ischaemia miatt nem biztosított (Back és mtsai., 1994b, Bere és mtsai., 2014). Így a megnövekedett metabolikus igény és a csökkent oxigén és glükóz ellátás következtében minden egyes tovaterjedő depolarizáció során egyre súlyosabb hipoxia és egyre növekvő laktát szint alakul ki (Gyngell és mtsai., 1994; Norris és mtsai., 1998). A folyamat végül az ismétlődő depolarizációk révén a sejt energiaháztartását egyre inkább felborítja, míg végül a sejt nem lesz képes visszaállítani a nyugalmi potenciált, s elhal. Mies és munkatársai (1993a) igazolták hogy az infarktus nagysága és a tovaterjedő depolarizációk száma között szoros összefüggés van. Megállapították továbbá, hogy az ischaemia első óráiban minden egyes tovaterjedő

depolarizáció több mint 20%-kal növeli az infarktus térfogatát. Nagy valószínűséggel ez az oka, hogy a tovaterjedő depolarizációt gátló glutamát receptor antagonista MK-801 csökkentette az agyi infarktus méretét állatkísérletben (Iijima és mtsai., 1992).

1.2.7.2. Excitotoxicitás

Röviddel az ischaemia után különböző neurotranszmitterek szabadulnak fel, melyek közül legtöbb figyelmet a glutamát kapott. Az ionotrop glutamát receptorok aktivációja kálcium beáramlást idéz elő az extracellularis térből, aminek következtében megnő a sejt kálcium tartalma, mely a kálcium-dependens katabolikus enzimek aktivációját, a mitokondriális kálcium emelkedését és így a mitokondrium működészavarát eredményezi (Siesjö és mtsai., 1999a). A metabotrop glutamát receptorok aktivációja az inozitol-trifoszfát útvonalat aktiválja, s az endoplazmatikus retikulum stressz válaszát és funkciózavarát váltja ki (Paschen, 1996). Magas koncentrációban a glutamát primer neuronális nekrózist képes kiváltani, de bizonyos körülmények között apoptosist is indukálhat (Choi, 1996).

1.2.7.3. Szabadgyökök

Alacsony vérátáramlás mellett az agyszövetben szabadgyökök felhalmozódását mutatták ki, melyek a nitrogen-monoxiddal reagálva peroxinitritet képeznek. A szabadgyökök a plazma membrán és az intracelluláris organellumok membránjának a károsítása révén ugyancsak az endoplazmatikus retikulum és a mitokondriumok működészavarát idézik elő (Chan, 1996; Hillered és Chan, 1998; Eliasson és mtsai., 1999; Siesjö és mtsai., 1999a; Siesjö és mtsai., 1999b; Paschen, 2003), emellett DNS fragmentációhoz vezetnek, s ezáltal apoptosist indukálnak (Lipton és Nicotera, 1998).

1.2.7.4. Mitokondriális károsodás

A citoplazmatikus kálcium szint emelkedése, csakúgy, mint a szabadgyökök felszaporodása a belső mitokondrium membrán permeabilitásának a növekedését eredményezi (Siesjö és mtsai., 1999a). Ennek következtében az oxidatív foszforilációhoz szükséges elektrokémiai grádiens gyengül, s így az ATP képződés csökken. Mindezen túl, a mitokondrium megduzzad, s végül a mitokondrium külső membrán is károsodik és apoptosist indukáló mitokondriális proteinek szabadulnak fel (Green és Kroemer, 2004; Zádori és mtsai., 2012). Ezek közül a legfontosabb a citokróm C és a caspase 9 felszabadulása, melyek a caspase 3 aktiválása révén közvetlenül részt vesznek az apoptosis folyamatában.

1.2.7.5. Endoplazmatikus retikulum funkciózavara

Az ischaemia során az endoplazmatikus retikulumban lévő kálcium a citoplazmába kerül, s így az endoplazmatikus retikulum kálciumtartalma lecsökken. Ennek következtében a protein-kináz R aktiválódik, foszforilálja, s ezáltal inaktiválja az eukarióta-iniciáció-faktort (eIF2alpha), mely a fehérjeszintézis károsodását vonja maga után (DeGracia és mtsai., 1999; Paschen, 2003).

1.2.7.6. Agyödéma

Az agyi ischaemiás károsodás egyik következménye az agyödéma, mely magát az ischaemiás károsodást kedvezőtlenül befolyásolhatja. Az agyödéma a kialakulását és annak idejét tekintve alapvetően két részre osztható: a korai fázisban a citotoxikus ödéma alakul ki, s ezt követi később a vazogén ödéma (Rosenberg, 1999; Rosand és Schwamm, 2001). A citotoxikus ödéma a cerebrális ischaemia azon szakaszában kezd kialakulni, amikor az anaerob metabolizmus veszi át az oxidatív foszforiláció helyét. Ilyenkor a sejt laktát szintje nő, növelve ezzel a sejt ozmolalitását. Az ischaemia további fokozódásakor, az anoxiás depolarizáció következtében nátrium áramlik be a sejtbe, mely vízbeáramlással párosulva a sejt további duzzadásához vezet (Tomita, 2005). Az intracelluláris térfogat növekedésével párhuzamosan az extracelluláris tér mérete csökken, ugyanakkor az agyszövet nettó víztartalma nem változik szükségszerűen. Mivel intracellulárisan a vízmolekulák diffúziója a sejtben lévő organellumoknak és fehérjéknek köszönhetően gátolt, megnő a csökkent diffúzióval jellemezhető vízmolekulák száma, mely jól kimutatható a diffúzió-súlyozott MRrel meghatározható ADC érték csökkenése által (Hossmann és Hoehn-Berlage, 1995). Ha az ischaemia nem teljes, vagyis egy alacsony, reziduális vérátáramlás fennmarad (s fokális cerebrális ischaemia esetén ez az általános), az agyszövet vizet vesz fel a vérből, s ezáltal az agyszövet nettó víztartalma nő. MCA okklúzió esetén ez a folyamat már néhány perccel az agyi ischaemia után elkezdődik. Az agyszövet víztartalma tovább nő, amikor az ischaemia után 3-6 órával szöveti nekrózis alakul ki, a vér-agy-gát károsodik, s ennek következtében a szérum fehérjéi a vérből az agyszövetbe jutnak. Ez a folyamat tovább fokozza a károsodott agyszövet víztartalmát, s extracelluláris, vazogén ödémát hoz létre, mely maximumát az ischaemia kialakulása után 1-2 nappal éri el. A vazogén ödéma következtében az agyszövet víztartalma 2-3-szorosára nőhet, s nagy agyi infarktus esetén ez olyan térfogatnövekedést eredményezhet, mely transtentorialis, vagy hátsó skála lézió esetén transforaminalis herniációhoz vezethet. Ez az úgynevezett malignus ödéma az életkilátások szempontjából a cerebrális ischaemia legrettegettebb szövődménye, mely sokszor ozmotikus dehidrálással sem kezelhető, s dekompresszív kraniektómiát tehet szükségessé (Walz és mtsai., 2002).

A vazogén ödéma és a sejtnekrózis kialakulásával az extracelluláris tér mérete növekszik, s ez az előzőekben említett gondolatmenetet követve az ADC érték normalizációjához vezethet. Az agyszövet nettó víztartalma ekkor azonban már fokozott, s az erre érzékeny T2-súlyozott felvételen ez szignál-intenzitás emelkedés formájában mutatkozik meg (Warach és mtsai., 1995), jelezve, hogy nem fiziológiás jelenségről van szó. Ezért, mivel egy patológiás folyamat következtében normalizálódik az ADC, ezt pszeudo-normalizációnak nevezték el (Lansberg és mtsai., 2001)

1.2.7.7. Gyulladás

Az ödéma mellett, az ischaemiás károsodás egy gyulladásos folyamatot is generál, mely az ödémához hasonlóan, az ischaemiás károsodás progresszióját eredményezheti (Del Zoppo és Hallenbeck, 2000). Mind a permanens, mind az átmeneti fokális agyi ischaemiában kimutatták a gyulladást kiváltó interleukinek (IL) megjelenését (IL-1-béta, IL6, IL10). Az IL-1-béta ischaemiás károsodást jelző hatását jól mutatja, hogy az IL-1-béta receptor antagonisták jelentősen csökkentették az infarktus méretét (Stroemer és Rothwell, 1997; Yang és mtsai., 1999). Az IL-1-béta expresszió fokozza az ICAM (intercellular adhesion molecule) megjelenését, mely 6-12 órával az ischaemia kezdete után éri el a csúcsát (Wang és Feuerstein, 1995). Mivel az ICAM-1 deficiens egerekben átmeneti MCA okklúzió után kisebb infarktus alakul ki, feltételezik, hogy az IL-1-béta okozta károsodás, legalábbis részben, az ICAM-1 aktiváció rovására írható (Soriano és mtsai., 1996).

1.2.8. Reperfúzió, reperfúziós károsodás

Fokális agyi ischaemiában a károsodás súlyosságát és kiterjedését alapvetően meghatározza, hogy sikerül-e visszaállítani az ischaemiás agyszövet vérellátását, és ha igen, mennyivel az ischaemia kialakulása után. A vérellátás helyreállításakor, mely történhet spontán, vagy kezelés hatására, az immár irreverzibilisen károsodott ischaemiás mag megmentésére természetesen nincs remény, jó esély van viszont a funkcióképtelen, de még életképes penumbra megmentésére, s funkciójának visszaállítására (Schaller és Graf, 2004). A korábbiakban írottakból egyértelmű, hogy az idő előrehaladtával egyre kisebb lesz a még megmenthető penumbra, s egyre nagyobb a már elhalt ischaemiás mag, ezért mindent meg kell tenni azért, hogy mihamarabbi recirkulációt tudjunk elérni. Erre ma már van lehetőség, feltéve, hogy a beteg idejében beér a megfelelő ellátó intézménybe, ahol trombolízist, vagy mechanicus thrombectomiát/embolectomiát tudnak végezni (The NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1995; Berkhemer és mtsai., 2015; Goyal és mtsai., 2015; Campbell és mtsai., 2015; Saver és mtsai., 2015; Jovin és mtsai., 2015; Donnan, 2015; Powers és mtsai., 2015).

Ugyanakkor a reperfúzió veszélyeket is rejt magában, melyek közül a cerebrális ödéma és az intracerebrális vérzés a legrettegettebb (The NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1997). Állatkísérletes tanulmányokban kimutatták, hogy hosszabb ischaemiás periódus után a reperfúzió mellett látott infarktus nagyobb volt, mint reperfúzió nélkül (Aronowski és mtsai., 1997). Kijelenthető tehát, hogy míg a jól megválasztott betegekben a reperfúzió az ischaemiás stroke kimenetelét alapvetően javítja, addig másokban az úgynevezett reperfúziós károsodás révén azt ronthatja is (Yang és Betz, 1994). Mivel a trombolízis és a trombektómia célja a reperfúzió előidézése, ezek a kezelések reperfúziós károsodással járhatnak (Aronowski és mtsai., 1997; Yang és Betz, 1994; Dietrich, 1994; Kuroda és Siesjö, 1997). Ahhoz, hogy ezt elkerüljük, vagy csökkentsük, fel kell ismernünk a reperfúziós károsodást és meg kell értenünk a patofiziológiáját.

A reperfúziós károsodás kimutatására és nyomon követésére alkalmas lehet az MR vizsgálat. Patkányokban, 1 órás MCA okklúziót követő 10 órás reperfúzió során azt találtuk, hogy a reperfúzió korai szakában (első két óra) az ischaemia alatt a szöveti károsodást jelző csökkent ADC érték szignifikánsan javult, majd újra csökkenni kezdett, egy másodlagos károsodást jelezve (Oláh és mtsai., 2000a). Hozzánk hasonlóan Neumann-Haefelin (2000) és Li és mtsai. (1999, 2000b) is hasonló eredményekre és következtetésekre jutottak.

A reperfúzió nemcsak másodlagos károsodást, hanem haemorrhagiás transzformációt is indukálhat. Ezt általában a reperfúzió során kialakuló hiperperfúziónak és vér-agy-gát károsodásnak tulajdonítják, de Adami és mtsai. (2002) kísérlete rávilágított arra, hogy a haemorrhagiás transzformáció elsősorban ott alakul ki, ahol az ischaemia végén alacsony volt az ADC érték (<550x10⁻⁶ mm²/s). Ezt a megfigyelést humán tanulmányban is megerősítették:

Selim és mtsai. 3 órás időablak mellett végzett rt-PA kezelés során a vérzéses transzformáció egyik legerősebb prediktorának az 550x10⁻⁶ mm²/s-es vagy az alatti ADC értéket találták (2002). Intra-arterialis rt-PA kezelés során Taleb és mtsai. (2001) azt is megfigyelték, hogy az alacsony ADC érték gyenge rekanalizációval és rossz klinikai kimenettel párosult.

1.2.9. Cerebrális reperfúziós károsodás mechanizmusa

1.2.9.1. Leukocita infiltráció

A leukociták a reperfúzió következtében elérik az ischaemiás agyszövetet és az endothelsejtekhez kapcsolódva elzárhatják a kapillárisokat, a neutrophil granulocitákból felszabaduló oxidánsok és proteolítikus enzimek révén károsítják a vér-agy-gátat, citokineket szabadítanak fel, s ezáltal lokális gyulladást hoznak létre. Ezek a folyamatok egy gyulladásos kaszkád kialakításával károsíthatják az ischaemia alatt kialakult penumbrát, s így ronthatják a stroke kimenetelét (Kuroda és Siesjö, 1997). Zhang és mtsai. igazolták, hogy 2 órás MCA okklúziót követő reperfúzió után 6 órával a neutrophil granulocyták az ischaemiás károsodás területében akkumulálódtak, mely sokkal kifejezettebb volt, mint permanens MCA okklúzió esetén (Zhang és mtsai., 1994), s az infarceált szövet térfogata jól korrelált a leukocyták infiltrációjával. A leukocyták szerepére hívták fel a figyelmet azok a kísérletek is, melyben neutropeniás rágcsálókban (Bednar és mtsai., 1991), vagy antineutrophil monoklonális antitesttel kezelt állatokban (Matsuo és mtsai., 1994) jobb reperfúziót és kisebb infarktus térfogatot tudtak kimutatni a kontroll állatokhoz képest.

1.2.9.2. A leukocita infiltráció molekuláris mechanizmusa

A leukociták – endothelsejtek közötti adhézió és interakció következtében a vér alakos elemei eltömeszelhetik a kapillárisokat, mely így megakadályozhatja a reperfúziót (no-reflow jelenség), s ezzel másodlagos ischaemiás károsodást hozhat létre (Hallenbeck és mtsai., 1986; Suval és mtsai., 1987; Janoff és mtsai., 1965; del Zoppo és mtsai., 1991; del Zoppo és Mabuchi 2003, Harlan, 1985; Lefer és mtsai., 1993; Nishigaya és mtsai., 1991). A cerebrális ischaemia majd reperfúzió során képződő szuperoxid szabadgyökök fokozzák az endotheliális P-selectin megjelenését, mely a leukociták P-selectin receptorával kapcsolódva erősítik a leukocita - endothelsejtek közötti kapcsolatot (Jean és mtsai., 1998). Emellett a leukocita beta-2 integrinjei (CD11a/CD18 és CD11b/CD19) az endothelsejtek ICAM-1 (intracelluláris adhéziós molekula) molekuláival kapcsolódva tovább fokozzák a leukocita-endothel kölcsönhatást, s egyben elősegítik a leukociták agyszövetbe jutását (Harlan, 1985; Lefer és mtsai., 1993; Nishigaya és mtsai., 1991; Jean és mtsai., 1998). A károsodott agyszövetbe jutó leukocitákból felszabaduló elasztáz, szabadgyökök, leukotriének és prosztaglandinok gyulladást okoznak, növelik az agyi erek permeabilitását, fokozzák az ödémát, s elősegítik a sejtek nekrózisát, hozzájárulva ezzel az ischaemia alatt elkezdődött szöveti károsodás progressziójához (Schaller és Graf, 2004; del Zoppo és mtsai., 1991; Carden és mtsai., 2000).

1.2.9.3. Trombocita-mediálta reperfúziós károsodás

Több tanulmány is igazolta, hogy az ischaemia utáni reperfúzió során a vérlemezkék aktiválódnak (Gawaz, 2004; Ko és mtsai., 1993; Rinder és mtsai., 1994), s a leukocitákhoz és az agyi kiserek endothelsejtjeihez kapcsolódva tovább rontják a "no-reflow" jelenséget. Humán tanulmányban a trombociták adhéziós molekuláit és a 11-dehidro-tromboxán-B2 vizelet koncentrációját, mint a vérlemezkék aktivációjának a markereit vizsgálták, s azt találták, hogy stroke betegekben szignifikánsan nagyobb volt a vérlemezke aktivitás mint a kontroll személyekben (Zeller és mtsai., 1999; van Kooten és mtsai., 1999). Patkány modellben átmeneti agyi ischaemia során a vérlemezke-neutrofil leukocita adhézió jelentősen nőtt a reperfúzió során a kontroll csoporthoz képest (Chong és mtsai., 2001), emellett az ischaemia-reperfúzió csoportban a vérlemezkék jelentős P-selectin expresszióját is kimutatták. A fentiek alapján feltételezték, hogy a vérlemezke – leukocita adhézióért, legalábbis részben, a vérlemezke membrán P-selectin expressziója a felelős. Az aktivált trombociták a kapillárisok obstrukcióját elősegítő leukocita - trombocita adhézió mellett, szerotonin, tromboxán A2 és szabadgyökök termelésén keresztül vazospazmust is indukálnak, tovább rontva a reperfúziót (Gawaz, 2004).

1.2.9.4. Komplement-mediálta reperfúziós károsodás

Reperfúzió során a komplement rendszer aktivációját is kimutatták (Collard és mtsai., 1999; D'Ambrosio és mtsai., 2001), beleértve a C3a, C5a, C5b-9 komplementeket. A komplementek közül a C5a és a C5b-9 komplementek szövetkárosító hatása a legismertebb, a C5b-9 "membrane attack complex" néven is ismeretes (Arumugam és mtsai., 2004; Hart és mtsai., 2004). A C5a komplement erős kemotaxis hatással rendelkezik, ezáltal szerepet játszhat az ischaemiás-reperfundált agyszövet leukocita infiltrációjában is, ezen felül számos proinflammatorikus citokin felszabadulását indukálja, felelős pl. az IL-1, IL-6, a tumor nekrózis faktor-alfa és a monocita kemoattraktáns protein-1 felszabadulásáért. Ez utóbbi fehérje károsíthatja a sejtmembránt, növelve ezáltal a membránpermeabilitást, de az IL-8 lokális indukcióján keresztül hozzájárulhat a leukociták szöveti akkumulációjához is. A komplement rendszer faktorainak a gátlása állatkísérletekben szignifikánsan csökkentette a reperfúziós károsodást (Meyer és mtsai., 2001; Fung és mtsai., 2003; Horstick, 2002).

1.2.9.5. Hiperperfúzió az ischaemiás szövet reperfúziója során

Az ischaemiát követő reperfúzió során nem ritka az átmeneti hiperperfúzió, mely hozzájárulhat a reperfúziós károsodáshoz, ödémát és vérzést okozhat (Pan és mtsai., 2007; Heiss és mtsai., 1997; Tamura és mtsai., 1980). Tovább ronthatja a károsodott agyszövet integritását a másodlagos hipoperfúzió, mely gyakran követi a hiperperfúziót (Heiss és mtsai., 1997; Tamura és mtsai., 1980). Állatkísérletben kimutatták (Heiss és mtsai., 1997), hogy míg 30 perces MCA okklúziót követően csak enyhe, átmeneti hiperperfúzió jelentkezett a reperfúzió elején, addig 1 és 2 órás MCA elzáródást követően a hiperperfúzió mértéke elérte az elzáródás előtti vérátáramlás érték közel 3-szorosát. A kísérletben a súlyosabb és hosszabb ideig tartó hiperperfúzió egyértelműen a rossz kimenetel jelzője volt. Egy másik tanulmányban a hiperperfúzió mértéke és a reperfundált területben megjelenő vérzés között találtak szignifikáns kapcsolatot (Tamura és mtsai., 1980). Nagy előrelépés volt a perfúziósúlyozott MR képalkotás bevezetése, mely lehetőséget adott az in vivo vérátáramlás monitorozására (Kidwell és mtsai., 2001). Ezt a módszert emberben alkalmazva intraarteriális trombolízist követően kimutatták, hogy a hiperperfundált területben nagyobb volt az infarktus rizikója, azonban a hiperperfúzió megléte vagy hiánya és a klinikai kimenetel között nem volt összefüggés, kapcsolatot találtak viszont a hipoperfundált terület és az ischaemiás stroke kimenetele között (Hillis és mtsai., 2004).

1.2.9.6. Vér-agy-gát károsodás a reperfúzió alatt

Az agyi ischaemiát követő reperfúzió során a vér-agy gát károsodása hozzájárulhat az ischaemiás károsodást szenvedett agyszövet vazogén ödémájához, vérzéses transzformációjához, valamint az agyi infarktus progressziójához (Yang és Betz, 1994; Sage és Duffy, 1984; del Zoppo és mtsai., 1998; Dobbin és mtsai., 1999). Állatmodellben 3 órás átemeneti agyi ischaemiát követő reperfúzió után már 3 órával vér-agy-gát károsodást észleltek, ezzel szemben 6 órás permanens MCA okklúzió után hasonló eltérés nem volt (Yang és Betz, 1994). A vér-agy-gát károsodása mellett, vagy épp annak részeként az ischaemiát szenvedett, majd reperfundált félteke víztartalma szignifikánsan nőtt, jelezve a kialakult ödémát (Dietrich, 1994; Kuroiwa és mtsai., 1990; Belayev és mtsai., 1996).

Az agy víztartalmára és ezáltal a cerebrális ödémára érzékeny MR technika a T2súlyozott MR képalkotási módszer, míg a vér-agy gát károsodás kimutatása a T1-súlyozott felvételeken megjelenő MR kontrasztanyag halmozáson alapszik (Fenstermacher és mtsai., 2003). A fenti módszerekkel in vivo követhető mind az ödéma, mind a vér-agy-gát károsodás. Patkánymodellben, 2.5 órás fokális ischaemiát követő reperfúzió alatt a T2-súlyozott felvételeken gyorsan nőtt a szignál intenzitás és a reperfundált szövetben MR kontrasztanyag halmozás jelent meg, mely eltérések a vér-agy gát károsdását és a cerebrális ödéma kialakulását jelezték (Neumann-Haefelin és mtsai., 2000). Ugyancsak patkánykísérletben vizsgálták a permanens MCA okklúzió, a rövid időtartamú (1 óra) MCA okklúzió utáni reperfúzió (korai reperfúzió) és a tartósabb (3 óra) MCA okklúzió utáni recirkuláció (késői reperfúzió) hatását a vér-agy-gátra, miközben vizsgálták az agyszövet perfúzióját (Kastrup és mtsai., 1999). Azt találták, hogy míg a késői reperfúziónak kitett állatok mindegyikében, addig a korai reperfúziós csoportban csak az állatok 40%-ában volt vér-agy-gát károsodás. A perfúzió-súlyozott vizsgálatok a késői reperfúzió esetén hiperperfúziót igazoltak, mely a korai reperfúzió csoportban nem volt kimutatható. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy hosszabb időtartamú ischaemiás periódus növeli a hiperperfúzió és a vér-agy-gát károsodás rizikóját.

Humán tanulmányban (Latour és mtsai., 2004) azt találták, hogy azokban a stroke betegekben, akikben reperfúziót sikerült kimutatni, gyakoribb volt a vér-agy-gát károsodás, mely rossz klinikai kimenetelt jelzett, s a korai vér-agy-gát károsodás független rizikója volt a vérzéses transzformációnak is. Rt-PA-val kezelt betegekben hasonló eredményt kaptak: véragy-gát károsodás a reperfúziót mutató betegekben gyakrabban fordult elő, mint akikben nem sikerült reperfúziót indukálni (Warach és Latour, 2004), mi több, a vér-agy-gát károsodás legerősebb független prediktora a reperfúzió volt. A vér-agy-gát károsodás ebben és egyéb tanulmányokban is összefüggést mutatott a vérzéses transzformációval és a rossz klinikai kimenetellel (Warach és Latour, 2004; Vo és mtsai., 2003).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A disszertációban alapvetően kétféle tanulmányról számolok be. Tudományos tevékenységem korai szakaszában Németországban, a Max-Planck-Intézetben állatkísérletekben MR és hisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk a fokális cerebrális ischaemia okozta agyi károsodás alakulását. Klinikus lévén, a kísérleteket úgy terveztük meg, hogy következtetéseket lehessen levonni az akut stroke prognózisával és kezelésével kapcsolatban. Később, hazatérésem után, emberben tanulmányoztuk az agyi keringés élettanát és kórélettanát.

2.1. ÁLLATKÍSÉRLETES MUNKÁINK HÁTTERE, MOTIVÁCIÓJA. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI

2.1.1. Állatkísérletes munkáink háttere – motiváció

Bár az elmúlt évtizedekben a stroke kezelésében egyértelmű áttörést jelentett az rt-PA mindennapi gyakorlatba történő bevezetése és a mechanikus thrombectomiák megjelenése (The NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1995; Berkhemer és mtsai., 2015; Goyal és mtsai., 2015; Campbell és mtsai., 2015; Saver és mtsai., 2015; Jovin és mtsai., 2015; Donnan, 2015; Powers és mtsai., 2015), a relatíve szűk terápiás időablak miatt az akut stroke-ban szenvedő betegek 80%-a továbbra is csak a hagyományos, nem rekanalizációs alapú kezelésben részesül. Emiatt jelenleg is létjogosultsága van a permanens cerebrális ischaemia területén tett erőfeszítéseknek, kutatásoknak.

Ismert, hogy az agiotenzin II (AII) egy erős vazokonstriktor tulajdonsággal rendelkező molekula, mely az angiotenzinogénből keletkezik az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hatására. Jól ismert, hogy az ACE inhibitorok alkalmazása, vagy az angiotenzin 1-es típusú receptorának (AT1) blokkolása ischaemiás stroke-ban javítja a neurológiai kimenetelt és csökkenti az infarktus térfogatát kísérletes fokális ischaemiában (Werner és mtsai., 1991; Yabuuchi és mtsai., 1999; Dai és mtsai., 1999; Nishimura és mtsai., 2000) és stroke betegekben is (Mark és mtsai., 2000). Ezek alapján **az angiotenzinnek valamint az angiotenzin receptoroknak fontos szerepe lehet az ischaemiás stroke patofiziológiájában, melyeknek pontos háttere nem volt tisztázott. Mivel egyre több beteg szed ACE inhibitort, illetve angiotenzin-receptor blokkoló szert a hipertónia kezelésére, fontos annak a tisztázása, hogy ezek a gyógyszerek milyen hatást fejtenek akut ischaemiás stroke esetén és kedvező hatásuk milyen módon érvényesül**. Munkánkban transzgén egerekben tanulmányoztuk az angiotenzin és az angiotenzin 1-es típusú receptorának az ischaemiás károsodásra gyakorolt hatását 1 és 24 órás permanens ischaemia során.

Mégha az ischaemiás stroke-ban szenvedő betegek mintegy 4/5-e jelenleg csak a hagyományos kezelésben részesülhet (aszpirin adása, stroke egységen történő kezelés, szövődmények megelőzése, korai rehabilitáció elkezdése), vitán felül áll, hogy akut **ischaemiás stroke-ban a legkedvezőbb hatás a megfelelő időablakon belül elkezdett mielőbbi rekanalizációs terápiától várható** (Donnan, 2015). Természetesen a betegekben végzett vizsgálatokat számos állatkísérlet előzte meg, melyben az átmeneti agyi fokális ischaemia hatását tanulmányozták, s melyek eredményei a rekanalizációs terápia elterjedésével fokozott hangsúlyt kaptak.
Az elmúlt évtizedekben a kísérletes átmeneti fokális agyi ischaemia tanulmányozásában az egyik legizgalmasabb eredményt az a megfigyelés szolgáltatta, miszerint rövid ideig tartó fokális ischaemiát követően a reperfúzió során az agyszövet energiametabolizmusa helyreáll, az ATP szint rendeződik, miközben a fehérjeszintézis gátolt marad (Folbergrova és mtsai., 1995; Hata és mtsai., 2000). Különböző reperfúziós időkkel végzett kísérletek azonban rámutattak, hogy az energiametabolizmus rendeződése a korai reperfúzió fázisában csak átmeneti, mert ezt a reperfúzió 2.-6. órájától az energiametabolizmus másodlagos károsodása, vagyis ATP depléció kíséri (Folbergrova és mtsai., 1995; Hata és mtsai., 2000). Az MR vizsgálatok és a különböző MR szekvenciák megjelenése forradalmasította az állatkísérleteket (Hossmann és Hoehn-Berlage, 1995, Fenstermacher és mtsai., 2003), hisz a perfúzió-súlyozott MR vizsgálat az agyi vérátáramlásról, a T2 súlyozott felvétel az agyszövet víztartalmáról, a diffúzió-súlyozott felvétel az intra- és extracelluláris vízterek változásáról, míg a kontrasztanyag extravazációja a vér-agy-gát károsodásról adott információt. A nem-invazív MR vizsgálatok térhódítása a kísérletes stroke kutatásban lehetővé tette, hogy ugyanabban a kísérleti állatban folyamatosan lehessen monitorozni a perfúziós viszonyokat, a vízmolekulák diffúziós sajátosságait, valamint az agyszövet víztartalmát a fokális ischaemia indukciója előtt, az ischaemia alatt és a reperfúzió különböző fázisaiban (Hossmann és Hoehn-Berlage, 1995). Mindehhez hozzájárult az úgynevezett "remote occlusion" technika kifejlesztése, mely lehetővé tette, hogy a megfelelően előkészített, operált állatban a kontroll MR vizsgálatokat követően úgy zárjuk el az arteria cerebri mediát, s később úgy idézzünk elő reperfúziót, hogy ahhoz az állatot az MRből ne kelljen eltávolítani (Kohno és mtsai., 1995). Ez a technika lehetőséget adott a pixel/voxel szintű analízisre. Multiparametriás, MR és hisztokémiai vizsgálatok összehasonlítása révén felvetették, hogy a diffúzió-súlyozott felvételekből származtatott ADC érték jól korrelál az energiametabolizmussal ischaemia alatt, de a reperfúziós időszakban ilyen irányú összefüggés nem volt ismert (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). Egyórás a. cerebri media okklúzió (MCAO) után hosszú reperfúziós időkkel végzett vizsgálatok megteremtették annak a lehetőségét, hogy mind a korai, mind a késői reperfúziós fázisban vizsgálhassuk az MR paraméterek alakulását és azoknak az ATP tartalommal, szöveti acidózissal való kapcsolatát. Bár jelenleg az akut stroke során a koponya CT a rutin vizsgálat, de ismert, hogy a különböző MR szekvenciák használatával és kombinálásval a stroke során kialakuló citotoxikus ödéma sokkal hamarabb kimutatható, mint a CT-n megjelenő elváltozások, emellett a stroke időtartama jobban megbecsülhető, s a prognózist illetően is pontosabb választ lehet adni a koponya MR-en látott eltérések alapján. A perszonalizált, költséghatékony kezelés iránti társadalmi igény terjedésével várható, hogy – legalább a stroke centrumokban – az MR vizsgálat az akut stroke ellátás nélkülözhetetlen része lesz és jobb beteg szelektálást tesz lehetővé a szövődmények megelőzésére, s a pontosabb prognózis becslés mellett a klinikai kezelés meghatározásában is feltehetően kulcsszerepet kap. Az ischaemiás stroke akut fázisában történő kísérletes vizsgálatok szerepét a fentiek alapján nem lehet eléggé hangsúlyozni, hisz a kísérletes eredmények klinikai rutinban történő alkalmazásával a stroke átvizsgálás és az akut kezelés tervezése nagymértékben javítható.

Természetesen az MR vizsgálat lehetőségei is korlátozottak, s bizonyos teóriák tisztázása csak biokémiai vizsgálatokkal lehetséges. Ilyen kérdés volt többek között az előbb

már említett másodlagos energiametabolizmus károsodás, mely a reperfúzió 2.-6. órája között kezdődik, s melynek hátterében számos hipotézist megfogalmaztak. Az egyik ilyen feltételezés volt az úgynevezett PARP /poli(ADP-ribóz) polimeráz/ hipotézis (Endres és mtsai., 1997), mely azt feltételezte, hogy a másodlagos energiametabolizmus károsodás, vagyis az ATP depléció a PARP enzim túlzott aktivációja miatti NAD felhasználás következtébenalakul ki. Egyik állatkísérletes munkánkban ennek a hipotézisnek a létjogosultságát teszteltük.

2.1.2. Állatkísérletes vizsgálataink célkitűzései

Állatkísérletes vizsgálatainkkal a következő kérdésekre kerestünk választ.

1) Különböző időtartamú (1 óra és 24 óra) permanens arteria cerebri media okklúzió során angiotenzinogent fokozottan expresszáló transzgén egerekben és angiotenzin-1A receptorhiányos egerekben hogyan alakul a protein szintézis és az energiametabolizmus, s az ezen paraméterekből meghatározható agyi infarktus és penumbra mérete a kontroll állatokhoz képest? Amennyiben szignifikáns eltérés jelentkezik, in vitro kísérletben, a vaszkuláris hatás kikapcsolása után is fennmarad-e a különbség a transzgén és a kontroll állatokból származó, oxigén-glükóz deprivációnak kitett sejtkultúrákban?

2) Egyórás fokális cerebralis ischaemiát követően hogyan alakulnak az MR paraméterek a reperfúzió alatt? Kimutatható-e az ADC értékek normalizálódása a reperfúzió korai fázisában, s megjelenik-e az energiametabolizmus másodlagos károsodásához hasonlóan az ADC másodlagos csökkenése a reperfúzió későbbi szakaszában? Kimutatható-e kapcsolat az energiametabolizmust jelző ADC változás és a szöveti víztartalomra utaló T2 relaxációs idő változása között? Megbecsülhető-e az ischaemia végén mért MR paraméterek alapján a stroke kimenetel, vagyis előrejelezhető-e a permanens szöveti károsodás, illetve a reperfúzió után jelentkező másodlagos szöveti károsodás?

3) Egyórás fokális cerebrális ischaemia után és az azt követő 1 órás és 10 órás reperfúziós időszak végén milyen kapcsolat mutatható ki az ADC érték valamint a szöveti ATP tartalom és a szöveti pH között. Meghatározható-e egy, az energiametabolizmus károsodását (ATP depléciót) illetve a szöveti acidózist jelző ADC küszöbérték az 1 órás MCAO végén és az átmeneti fokális agyi ischaemia különböző reperfúziós időszakaiban? A diffúzió-súlyozott MR felvételekből származtatott ADC érték használható-e az agyi energiametabolizmus markereként?

4) Milyen összefüggés van a NAD szint és az energiametabolizmusban bekövetkező változás között fokális cerebrális ischaemiát követő reperfúzió során? Támogatják-e ezek az adatok a PARP hipotézist, miszerint az ATP depléció oka a túlzott PARP aktiváció következtében kialakuló NAD hiány lenne?

2.2. HUMÁN VIZSGÁLATAINK HÁTTERE, MOTIVÁCIÓJA. HUMÁN TANULMÁNYAINK CÉLKITŰZÉSEI

2.2.1. Humán vizsgálataink háttere – motiváció

Az idegrendszer megfelelő működésének feltétele a mindenkori igényekhez szükséges glükóz és oxigén ellátás folyamatos biztosítása, melyet egy térben és időben precízen kontrollált folyamat, az úgynevezett neurovaszkuláris kapcsolat biztosít (Dirnagl, 1977; Filosa és Blanco, 2007; Koehler és mtsai., 2009; Dunn és Nelson, 2010), s melynek pontos mechanizmusa máig nem tisztázott. A neurovaszkuláris kapcsolat során a regionális vérátáramlás változás az agyi mikroerek vazodilatációján és vazokonstrikcióján keresztül valósul meg (Metea és Newman, 2006), melyet az erekre ható rizikófaktorok és egyéb vazoaktív stimulusok jelentősen befolyásolhatnak.

Jól ismert, hogy a dohányzás a szívbetegség, a stroke és az alsó végtagi perifériás érbetegség komoly rizikófaktora, mely rizikó az elszívott cigaretták számával és a dohányzás időtartamával arányosan nő (Burns, 2003). Ez a fokozott stroke rizikó, attól függően, hogy a vizsgált személy milyen erős dohányos volt, csak évekkel a dohányzás elhagyása után normalizálódik (Kawachi és mtsai., 1993; Wannamethee és mtsai., 1995). A dohányzás okozta vaszkuláris károsodás hátterében komplex folyamat áll: endotheliális diszfunkciót, trombocita aktivációt okoz, fokozza a gyulladásos folyamatokat, hiperkoagulabilitáshoz vezet (Vapaatalo és Mervaala, 2001), hozzájárul a szabadgyökök fokozott képződéséhez és ezáltal csökkenti az NO bioaktivitást (Raij és mtsai., 2001), s fokozza a vazokonstrikciós hajlamot (Lassila és mtsai., 1988). A fenti folyamatok következtében kimutatták, hogy a krónikus dohányzás hatására csökken a nyugalmi vérátáramlás (Kubota és mtsai., 1983; Rogers és mtsai., 1983; Rogers és mtsai., 1985; Yamashita és mtsai., 2000). Ugyanakkor csak kevés tanulmányban vizsgálták a krónikus dohányzás cerebrális vazomotor aktivitásra kifejtett hatását és a közölt eredmények sem voltak egységesek (Rogers és mtsai., 1984; Silvestrini és mtsai., 1996; Terborg és mtsai., 2002). Emiatt vizsgálatainkkal arra kerestünk választ, hogy a krónikus dohányzás fiatal, egészséges személyekben károsítja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges vazodilatációt, s ha igen, akkor ez a folyamat mennyire reverzibilis.

Nemcsak a dohányzás, de az alkoholfogyasztás is befolyásolhatja az agyi keringést. Az akut alkoholfogyasztás az egyik ismert kiváltó oka az ortosztatikus diszfunkciónak, ami neurokardiogén syncope-hoz vezethet (Narkiewicz és mtsai., 2000; Tateoka és mtsai., 2007; Takahashi és mtsai., 2008; Carter és mtsai., 2011). Japán kutatók (Tateoka és mtsai., 2007; Takahashi és mtsai., 2008) alkoholfogyasztás utáni ismeretlen eredetű syncope vizsgálatakor kimutatták, hogy akut alkoholfogyasztást követően ortosztatikus stressz során a betegek több mint 1/3-ánál jelentkezett agyi hipoperfúzió, s ezáltal syncope. **Az akut alkoholfogyasztás ortosztatikus toleranciát befolyásoló hatásán túl a közelmúltban megállapították, hogy az alkohol már egy órával a bevitelét követően növeli a stroke kockázatát (Mostofsky és mtsai., 2016). Munkánkban az alkohol ortosztatikus stressz során kialakuló hemodinamikai változásokra gyakorolt hatását vizsgáltuk.**

Jól ismert, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat során a neuronális aktiváció indukálta áramlási válasz lokális vazodilatáció következtében jön létre (Metea és Newman, 2006). Tanulmányaink egyik fő célja annak a megválaszolása volt, hogy **egyéb mechanizmus útján** indukált vazodilatáció, vagy vazokonstrikció befolyásolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialkulásához szükséges cerebrális vazodilatációt. Az agyi mikroerekben számos módszerrel lehet vazodilatációt kiváltani (Csete és mtsai., 2004), az egyik ilyen módszer az acetazolamid (AZ) adás. Egyesek szerint 15 mg/kg adagban az AZ maximális (Dahl és mtsai., 1995), mások szerint jelentős, de nem maximális cerebrális vazodilatációt idéz elő (Gommer és mtsai., 2008). Nem volt ismert azonban, hogy az AZ adás és a neurovaszkuláris kapcsolat során kialakuló dilatáció a rezisztenciaerek szintjén azonos, vagy különböző útvonalakon valósulnak meg, mint ahogy az sem, hogy az AZ okozta vazodilatáció gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat létrejöttét. Ennek megválaszolására AZ (acetazolamid) adás után vizsgáltuk a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási választ az a. cerebri posteriorban.

Nemcsak a vazodilatáció befolyásolhatja a neurovaszkuláris kapcsolatot, hanem az azzal ellentétes érválasz, a vazokonstrikció is. Munkáink során a cerebrális vazokonstrikció indukciójához hiperventilációt és NSAID adást alkalmaztunk. Hiperventiláció során a vér pCO₂ szintje csökken, alkalózis jön létre, s ennek következtében alakul ki az agyi rezisztenciaerekben vazokonstrikció. Korábban a hiperventiláció következtében kialakuló hipokapnia és a következményes cerebrális vazokonstrikció neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatása nem volt ismert. Mivel gyakorta végzünk hiperventilációval járó tevékenységet (sietünk, futunk, munkát végzünk), illetve kórházi kezelések során a betegek egy része lélegeztetésre szorul, ahol alkalmazhatnak hiperventilációt, fontos annak az ismerete, hogy a hipokapnia milyen mértékben hat az agyi vazomotor aktivitásra. Jól ismert tény, hogy egyes NSAID-ok (pl. indometacin) szintén cerebrális vazokonstrikciót okoznak. Állatkísérletek azt is igazolták, hogy a neuronális aktiváció kiváltotta regionális vérátáramlás változáshoz ciklo-oxigenáz és nitrogén-monoxidszintetáz szükséges (Girouard és Iadecola, 2006; Koehler és mtsai., 2006; Filosa és Blanco, 2007; Leithner és mtsai., 2010). A ciklo-oxigenáz enzim (COX) működése révén az arachidonsavból prastaglandin G2 és prostaglandin H2 képződik, mely különböző útvonalakon további, biológiailag hatékony prosztaglandinokká (PG) alakul át. Mivel ezen prosztaglandin termékek többségének (prosztaciklin, thromboxan, PGE2, PGD2, PGF2 alpha) vazoaktív tulajdonsága van, nem meglepő, hogy a COX enzim gátlásának befolyása lehet az agyi véráramlásra is (Mitchell és Warner, 2006). A fő COX inhibitorok a nem-steroid gyulladásgátlók (NSAID), melvek közül a legintenzívebben a nem-szelektív NSAID-ok közé tartozó, potens vazokonstriktív hatással bíró indometacint vizsgálták. Az indometacinról kimutatták, hogy intravénásan adva 20-40%-kal csökkentette az agyi vérátáramlást, sőt gátolta a hiperkapnia és az acetazolamid indukálta vazodilatációt (Pickard és MacKenzie, 1973; Sakabe és Siesjö, 1979; Wang és mtsai., 1993; Csete és mtsai., 2001), csakúgy mint a neurovaszkuláris kapcsolatot (Girouard és Iadecola, 2006; Filosa és Blanco, 2007; Bruhn és mtsai., 2011). Nem találtunk azonban arra vonatkozó adatot, hogy a szokásos indometacin adag orálisan adva gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását emberben, mint ahogy az sem volt ismert, hogy egyéb nem szelektív NSAID készítménynek van-e hasonló hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra. A kérdés vizsgálatához indometacin és naproxen hatás alatt vizsgáltuk a neuronális aktiváció indukálta áramlási választ. Kérdésünk klinikai fontosságát az adja, hogy a stroke elsősorban az idősek betegsége, akik a korral járó mozgásszervi panaszok miatt gyakran szednek **NSAID-ot.**

Magyarországon legalább 30 ezer vak ember él, akiknek 10%-a "sötétvak", vagyis semmit sem lát (Kiss és Németh, 2013). Bár a világról szerzett információink túlnyomó többségét a látás útján szerezzük, mégsem kap elegendő figyelmet ez a terület. Ahhoz, hogy a látássérültek rehabilitációja minél sikeresebb legyen, meg kell értenünk a vakok környezetükről szerzett információgyűjtésének módját és mechanizmusát. Az elmúlt évtizedekben a vizuális stimuláció kiváltotta, az a. cerebri posteriorban létrejövő áramlási választ intenzíven vizsgálták, munkacsoportunknak is ez volt az egyik fő érdeklődési területe. Érdekes módon azt találták, hogy vakokban a Braille írás olvasásához ugyanúgy szükség van a látókéreg épségére, mint látókban a nyomtatott szöveg olvasásához (Hamilton és mtsai., 2000). PET vizsgálatok is igazolták, hogy vakokban Braille olvasás során aktiválódik az occipitális kérgi régió (Sadato és mtsai., 1996; Sadato és mtsai., 1998). Míg azonban látókban pontosan leírták a nyomtatott szöveg olvasásakor az a. cerebri posteriorban kialakuló áramlási válasz dinamikáját és mértékét, addig vakokban ez Braille olvasáskor nem volt ismert. Ahhoz, hogy ezt megválaszoljuk, korai vakokban vizsgáltuk a Braille olvasás során az a. cerebri posteriorban detektált áramlási sebességet, s ezt hasonlítottuk a látók olvasása során mért értékekhez.

2.2.2. Humán vizsgálataink célkitűzései

Az agyi keringés szabályozásában mind az agyi vérátáramlás állandóságát biztosító autoreguláció, mind a neuronális aktiváció hatására kialakuló lokális vérátáramlás fokozódása, azaz a neurovaszkuláris kapcsolat kulcsszerepet játszik. Munkánk során az agyi keringés élettanának és kórélettanának mélyebb megismerését, az agyi vérátáramlás különböző hatásokra bekövetkező változásainak tanulmányozását, a cerebrális vazoreaktivitás vizsgálatát tűztük ki célul.

Ennek során azt vizsgáltuk, hogy egészséges személyekben **egyes stroke rizikófaktorok, valamint az agyi erekre ható vazoaktív stimulusok befolyásolják-e az agyi erek reaktivitását**. Két nagy kérdést szerettünk volna ezen belül megválaszolni:

 Hogyan befolyásolják az agyi rezisztenciaerek működését egyébként egészséges fiatalokban olyan stroke rizikófaktorként számon tartott tényezők, melyek a populáció jelentős részét érintik. A kérdést specifikálva: stroke rizikófaktorok, mint az alkoholfogyasztás, illetve a dohányzás gátolják-e az ortosztatikus stressz okozta csökkent agyi perfúziós nyomás kompenzálásához, illetve a neurovaszkuláris kapcsolat működéséhez szükséges cerebrális vazodilatációt.

A kérdés megválaszolásához megvizsgáltuk, hogy

- az akut alkoholfogyasztás befolyásolja-e az ortosztatikus reakció (head-up tilt teszt) kiváltotta alacsonyabb agyi perfúziós nyomás hatására jelentkező kompenzatorikus vazodilatációt?
- a krónikus dohányzás gátolja-e a vizuális stimuláció hatására kialkuló áramlási választ a látókérget ellátó arteria cerebri posteriorben, vagyis befolyásolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását? Ha igen, a dohányzás elhagyása után fél-másfél évvel visszatér-e a neurovaszkuláris kapcsolat működése az egészséges, nem dohányosokban mért szintre?

2) Másik fő kérdésünk az volt, hogy **egészséges személyekben a neuronális aktiváció** hatására kialakuló lokális vazodilatációt, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolatot befolyásolják-e az agyi rezisztenciaerek konstrikcióját, illetve dilatációját okozó tényezők? Más szóval, a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulása független-e az agyi rezisztenciaerek átmérőjét befolyásoló egyéb tényezőktől?

Hogy a felvetett kérdésekre választ adjunk, megvizsgáltuk, hogy

- a potens vazodilatátor hatással bíró acetazolamid gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásakor a vaszkuláris válasz során normálisan bekövetkező vazodilatációt, más szóval acetazolamid adása után csökken-e a vizuális stimulus kiváltotta áramlási válasz az arteria cerebri posteriorban?
- a vazokonstrikciót okozó hipokapnia hatására csökken-e a vizuális inger indukálta áramlásváltozás mértéke a látókérget ellátó arteriában?
- az ugyancsak vazokonstrikciót kiváltó indometacin, illetve az indometacinhoz hasonlóan nem szelektív, széles körben használt COX enzimet gátló naproxen károsítja-e a vizuális stimuláció indukálta áramlási választ az arteria cerebri posteriorban?
- Ehhez a kérdéscsoporthoz soroltuk azt a tanulmányunkat is, mely arra kereste a választ, hogy a korai vakok occipitalis kérge szerepet játszik-e az olvasásban, és milyen mértékű és dinamikájú áramlásváltozás jelentkezik Braille olvasás során ebben a régióban korai vakokban. Vizsgáltuk azt is, hogy látókban a vizuális stimuláció hatására kialakuló áramlásnövekedéshez milyen mértékben járul hozzá az olvasáshoz elengedhetetlen fénystimulus és milyen mértékben maga az olvasás lényegét képező betű- és szófelismerés.

3. MÓDSZEREK

3.1. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINKHOZ HASZNÁLT KÍSÉRLETI ÁLLATOK ÉS MÓDSZEREK

Az állatkísérleteket minden esetben a National Institutes of Health állatvédelmi ajánlásainak megfelelően a helyi állatvédelmi hivatalok jóváhagyásával végeztük.

3.1.1. Az angiotenzin hatásának vizsgálata egerekben permanens agyi ischaemiában

A vizsgálat célja az angiotenzin (AII) és az angiotenzin 1-es típusú receptor (AT1 receptor) szerepének a meghatározása volt cerebrális ischaemiában. Ezért az irreverzibilis ischaemiás károsodás és a penumbra méretét 1 és 24 órás permanens MCAO végén vizsgáltuk vad típusú egerekben, patkány angiotenzinogént fokozottan expresszáló transzgén egerekben (TGM123) (Kimura és mtsai., 1992) és AT1 receptorhiányos egerekben (Ito és mtsai., 1995). A hemodinamikai paraméterek különbségéből eredő hatások kiküszöbölése céljából in vitro tanulmányt is végeztünk, melyben vad típusú egerek és AT1 receptorhiányos társaik embrióiból származó primer neuronális sejtkultúrát oxigén-glükóz deprivációnak tettünk ki.

Állatok, állatkísérlet

A kísérlethez használt felnőtt nőstény egereket a Benjamin Franklin Egyetemen (Berlin, Németország) tenyésztették. Az állatokat kettes-hármas csoportokban tartottuk 22°C hőmérsékletű szobában, melyben 12 órás világos és sötét időszakok váltották egymást.

A kísérlethez használt egereket 1.5 % halotánt tartalmazó 70%:30% arányú N₂O:O₂ keverékkel altattuk. A belső hőmérsékletet rektális hőmérővel monitoroztuk és feed-back fűtő pad segítségével az állatok testhőmérsékletét 37°C körül tartottuk. Arteriás vérgáz és arteriás vérnyomás méréséhez a bal a. femoralist PE-50 polythene katéterrel kanüláltuk. A kísérleti állatokban az artériás vérgáz értékeket 10 perccel az MCAO előtt és után meghatároztuk. A fokális cerebrális ischaemiát a bal MCA elzárásával hoztuk létre, melyhez szilikonnal (Xantopren; Bayer Dental, Osaka Japan) megvastagított végű sebészi fonalat használtunk (Hara és mtsai., 1996; Hata és mtsai., 1998). Az állatok egy részében 1 órás, míg a másik részében 24 órás permanens MCAO hatását vizsgáltuk. A 24 órás okklúziós csoportba tartozó állatokat visszaengedtük a ketrecükbe és intraperitoneálisan 5% glükózt tartalmazó fiziológiás sóoldatot adtunk (2x0.8 mL), hogy a víz és glucose háztartásukat fenntartsuk.

Lézer Doppler áramlásmérés

Egy lézer Doppler áramlásmérő szondáját a bal MCA ellátási területe fölé (a koronális és szagittális varrat találkozását jelző bregmától 2 mm-re kaudálisan és a középvonaltól 6 mm-re laterálisan) helyeztük és azt a csonthoz rögzítettük. Az áramlást a kísérlet kezdetétől az MCAO után 15 percig monitoroztuk. Csak azokat az állatokat vontuk be a tanulmányba, amelyekben a lézer Doppler szignál az MCAO után a kiindulási érték 25%-a alá esett.

Autoradiográfiás mérések

A kísérlet befejezése előtt 45 perccel ³H-mal jelölt L-[4,5-³H]-leucint (300 mCi/egér, specifikus aktivitás 151 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig, Németország), s a kísérlet vége előtt 2 perccel ¹⁴C izotóppal jelölt 4-iodo-N-methyl-[¹⁴C]-antipyrinet (20 mCi/egér, specifikus

aktivitás 40-60 mCi/mmol; Biotrend Chemicals, Köln, Németország) adtunk intraperitoneálisan az agyi protein szintézis és agyi vérátáramlás meghatározása céljából (Hara és mtsai., 1996). Az 1 órás csoportban az egereket végig halotánnal altattuk. A 24 órás ischaemiás csoportban a fenti intraperitoneális injekciók beadásához a kísérlet vége előtt az egereket rövid időre halotánnal elaltattuk, majd a kísérlet végén folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az egerek agyát és szívét -20°C-os boxban távolítottuk el, s ugyancsak mínusz 20°C-on az egerek agyát 20 µm vastag metszetekre vágtuk kriosztát mikrotómmal. A szeleteket ATP biolumineszcenciás meghatározáshoz fedőlemezre, míg a szomszédos szeletet protein szintézis és agyi vérátáramlás meghatározás céljából tárgylemezre helyeztük.

ATP szint, agyi protein szintézis, agyi vérátáramlás regionális meghatározása

Az ATP meghatározást ATP specifikus biolumineszcenciás módszerrel mértük, a protein szintézist és az agyi vérátáramlást [¹⁴C]-[³H] dupla-nyomjelző izotóp-technikával határoztuk meg. Az agyi vérátáramlás autoradiográfiás méréséhez az agyszeleteket [¹⁴C] standarddel együtt 12 napon át Hyperfilmre (Kodak, Rochester, NY, U.S.A.) exponáltuk. A protein szintézis méréséhez ugyanazt a szeletet 10%-os triklórecetsavban inkubáltuk, hogy a szabad, ³H-mal jelölt leucint és a jelölt proteinektől eltérő egyéb metabolitokat eltávolítsuk. A metszeteket [³H] standarddel együtt 14 napon át ³H szenzitív filmre (Hyperfilm [3H]; Amersham, Braunschweig, Németország) exponáltuk (Mies és mtsai., 1991). A quantitatív agyi véráramlás méréshez a fagyasztott szívből a vért eltávolítottuk, hogy a végső artériás [¹⁴C] radioaktivitást, s ebből az agyi véráramlást meghatározhassuk (Maeda és mtsai., 2000).

A metabolikus eltérések morfometriai vizsgálata

A biolumineszcenciás és autoradiográfiás képeket CCD kamerával digitalizáltuk és az NIH Image "ImageMG" szoftverrel analizáltuk (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.). Az ATP térképeken, a károsodott energiametabolizmus területét a kontralaterális félteke ATP koncentráció átlagának 30%-nál kisebb értékek alapján, míg az agyi fehérjeszintézis károsodását jelző küszöbértéket az ellenoldali, ischaemiát nem szenvedett félteke legalacsonyabb fehérjeszintézis értéke alapján határoztuk meg. Az ATP hiányos és gátolt fehérjeszintézist mutató területeket a caudatum-putamen szintjében mértük és az ellenoldali félteke területének százalékában fejeztük ki.

Az energiametabolizmus és a fehérjeszintézis károsodását előidéző véráramlási küszöböt úgy határoztuk meg, hogy az ATP biolumineszcenciás és a fehérjeszintézis térképet, valamint a véráramlást jelző autoradiográfiás képeket egymásra helyeztük, s az ipszilaterális féletekében minden 10 mL/100 g/min értékhatárban meghatároztuk az ATP és proteinszintézis felvételeken a pixelek számát. Ezen pixelek közül a metabolikus károsodást mutató pixelek arányát meghatároztuk, s azt minden áramlási értékhatáron belül százalékos értékben fejeztük ki. A perfúziós küszöböt annál az interpolált véráramlási értéknél definiáltuk, melynél a pixelek 50%-a jelzett metabolikus károsodást (Maeda és mtsai., 2000).

Neuronális sejtkultúra, oxigén-glükóz depriváció és sejthalál analízis

A primer cerebrális cortex neuronális sejtkultúrát vad típusú és AT1 receptorhiányos egerek embrióiból kaptuk. A sejtkultúra kialakítása Brewer és mtsai. (1995) patkányokra kifejlesztett és módosított módszere alapján történt (Harms és mtsai., 2000). A sejteket

36.5°C-on tartottuk. A 10. napon a sejtkultúra médiumát eltávolítottuk és megőriztük. A sejtkultúrát kétszer PBS (foszfát-puffer sóoldat) oldattal mostuk, majd a sejteket oxigén és glükóz deprivációnak tettük ki 120 percre úgy, hogy a sejteket glükóz hiányos sóoldatba helyeztük s a pO₂-t 2 Hgmm alatt tartottuk. Ezt követően a fenti sóoldatot eltávolítottuk, s a sejtekről eltávolított és megőrzött eredeti médiumot visszaadtuk (Harms és mtsai., 2000; Bruer és mtsai., 1997). Az AT1 receptorok gátlásához a vad típusú egerek sejtkultúráját vízben oldott losartannal 1 órával az oxigén-glükóz deprivációt megelőzően előkezeltük. A losartan koncentrációja a médiumban 1 illetve 10 μM volt. Az oxigén-glükóz depriváció után 24 órával a neuronális károsodás quantitatív meghatározásához a médium laktát-dehidrogenáz (LDH) koncentrációját mértük (Koh és mtsai., 1987). A kinetikus LDH teszthez az enzimstandardot a Sigma Chemie GmbH szolgáltatta (Deisenhofen, Németország).

Statisztikai analízis

Az összes adatot átlag±SD formájában adtuk meg. A fiziológiás értékekben, metabolikus paraméterekben és regionális vérátáramlási értékekben a vad típusú és genetikailag módosított egerek között tapasztalt különbségeket mindkét időpontban (1 órás és 24 órás MCAO) ANOVA-val hasonlítottuk össze, majd Scheffe post-hoc tesztet végeztünk. A 10 perccel az MCAO előtt és után mért fiziológiai értékeket páros t-teszttel hasonlítottuk össze. A medium LDH szintjében mérhető különbségeket ANOVA segítségével értékeltük, majd post-hoc Tukey tesztet végeztünk. A p<0.05 szintet tetkintettük szignifikánsnak.

3.1.2. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatának vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában

Mivel fokális ischaemiában az ischaemia időszakában az ADC érték és a szöveti energiametabolizmus között kapcsolatot találtak (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995), MR vizsgálatainkkal arra kerestünk választ, hogy 1 órás átmeneti agyi fokális ischaemia reperfúziós szakában az ADC értékek az ATP-hez hasonlóan javulnak-e a reperfúzió korai, s rosszabbodnak-e a reperfúzió későbbi fázisában, más szóval a diffúzió súlyozott MR vizsgálattal kimutatható-e az ADC másodlagos csökkenése. Egy másik tanulmányunkban arra kerestünk választ, hogy az ischaemiás időszakhoz hasonlóan ki lehet-e mutatni a reperfúzió idején is az energiametabolizmus és az ADC érték közötti kapcsolatot, s meghatározható-e egy, az energiametabolizmus károsodását (ATP depléciót) illetve a szöveti acidózist jelző ADC küszöbérték az 1 órás MCAO végén és az átmeneti fokális agyi ischaemia különböző reperfúziós időszakaiban?

Mivel a kísérleti állat műtétje és az MR vizsgálat a két kísérletben hasonló volt, a módszereket nem külön-külön, hanem egybevonva ismertetem, s külön jelzem azokat a vizsgálatokat, melyek csak az egyik kísérletben történtek meg.

Állatok, állatkísérlet

A kísérletekben 300-350 g Wistar patkányokat operáltunk, melyeket 1.5 % halotánt tartalmazó 70%:30% arányú N₂O:O₂ keverékkel altattuk. A belső hőmérsékletet rektális hőmérővel monitoroztuk és feed-back fűtő pad segítségével 37°C körül tartottuk.

Gyógyszerek adása, a szisztémás vérnyomás ellenőrzése és vérvételek céljából az a. femoralist és v. femoralist kanüláltuk. Tracheotomiát követően a patkányokat mechanikusan lélegeztettük és óránként 0.3 mg/kg pancuronium bromiddal immobilizáltuk. A lélegeztetés elkezdése után a halotán koncentrációt 1%-ra csökkentettük. A vérgázokat rendszeresen ellenőriztük és a respirátor megfelelő beállításával élettani határok között tartottuk.

A megfelelően előkészített állatokat nem mágneses stereotaxiás tartóba tettük, ahol a fejüket rögzítettük, majd a már megoperált állatokat 4.7 Teslás állat MR-be helyeztük. A jobb MCA elzárása az MR-ben történt egy úgynevezett távolról mozgatható 4-0 nylon fonál (4-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Németország) segítségével, melynek a disztális végét szilikonnal 0.28-0.30 mm átmérőjűre vastagítottunk. Az operáció leírása részletesen megtalálható a Kohno és mtsai. (1995) által közölt közleményben, a rövid leírás az alábbiakban olvasható. A szilikonnal megvastagított végű fonalat egy mikrokatéterhez rögzítettük, melyet egy nagyobb vezetőkatéterbe helyeztünk. A műtét során a jobb a. carotis communist leklippeltük, az a. carotis externát és internát kipreparáltuk, az externa ágait lekötöttük, majd az a. carotis interna klippelése után az a. carotis externát, annak disztális lekötése után a disztális végénél elvágtuk. A vezetőkatétert ezt követően a nyakhoz rögzítettük és a nylon fonalat a kipreparált és megfelelően pozícionált a. carotis externán keresztül a jobb a. carotis internába vezettük, s azt addig toltuk előre, míg a fonál szilikonozott vége el nem érte a koponyaalapot. Az a. carotis externa mobilizált végét lekötöttük és azt a vezetőkatéterhez rögzítettük. Ez a műtéti technika lehetővé tette, hogy a kísérleti állat mozgatása nélkül, immár az MR alagútban a mikrokatéter előretolásával a szilikonozott fonállal elzárjuk az MCA-t, s 1 óra eltelte után a fonál visszahúzásával reperfúziót indukáljunk. Az MCAO-t a perfúzió-súlyozott MR felvételen a perfúziós szignál intenzitás kifejezett csökkenése igazolta, majd 1 órás fokális ischaemiát követően a reperfúziót a perfúziós szignál intenzitás növekedése jelezte.

Mágneses rezonancia képalkotás

A mágneses rezonancia méréseket Bruker Biospec típusú (Bruker Medical, Ettlingen, Németország) 4.7 T, 30 cm belső átmérőjű készülékkel végeztük. A készülék megfelelően árnyékolt grádiens tekercset tartalmazott, melynek paraméterei a következők voltak: maximum grádiens erősség 100 mT/m; grádiens növekedési idő < 250 us. A radiofrekvenciás jeladáshoz egy 12 cm átmérőjű Helmholz tekercset használtunk, míg a radiofrekvenciás jelek vételére egy, a kísérleti állat feje fölé helyezett, 16 mm átmérőjű felszíni tekercs szolgált. A két tekercs egymásra merőleges helyzetű volt. A fej megfelelő pozícionálásához gradiens echo képalkotással készült szagittális síkú képeket használtunk (echo idő/EI/=8.3 ms, repetíciós idő/RI/=300 ms).

A diffúzió súlyozott képekhez Stejskal-Tanner típusú spin-echo szekvenciát használtunk (Stejskal és Tanner, 1965). A szekvencia paraméterei a következők voltak: EI=35.2 ms, RI=2325 ms, matrix=128x128. A vizsgálat során 6 koronális felvételt készítettünk, melyek vastagsága 1.21 mm, a szeletek közötti távolság 0.54 mm, a vizsgálati terület 4x4 cm² volt. Az ADC (apparent diffusion coefficient) meghatározásához különböző grádiens erősséggel készült diffúzió-súlyozott felvételeket készítettünk (gradiens erősség=30 s/mm², illetve 1500 s/mm²), melyek alapján az ADC értékek pixelenként kiszámíthatók voltak (Le Bihan és mtsai., 1988). A számításhoz a MEMRIS szoftwert használtuk (IDL; Research Systems, Boulder, Co, U.S.A.).

Egyszeletes perfúzió-súlyozott felvételt készítettünk az MCA ellátási területének a központjában (a caudatum-putamen szintjében), melyhez artériás spin-jelölés technikát használtunk (Detre és mtsai., 1994). A perfúzió-súlyozott szekvencia két hasonló adatgyűjtési időszakból állt, melyek között 10 s szünet volt. Mindkét aktív időszakban elsőként egy 3 s-os magnetizációs szakasz volt, melyet a felvétel követett (snapshot FLASH képalkotás, matrix 128x64). Az EI 3.9 ms, a RI 7.4 ms, a vizsgálati terület 4x4 cm², a rétegvastagság 2 mm volt (Kerskens és mtsai., 1995). A jel/zaj arány javítása céljából 8 felvétel készült, melyeket átlagoltunk. Az átlagolt felvételeket a kontroll felvétel értékeire normalizáltuk, melynek során arteriás spin jelölés nem történt.

A fentieken túl **az ADC másodlagos csökkenését vizsgáló kísérletünkben** 6-szeletes T2-súlyozott felvételek is történtek azokban a síkokban, ahol a diffúzió-súlyozott képeket készítettük. A T2-súlyozott felvétel készítése során az echo idő 12.5 ms, a RI 3 s volt (matrix 128x128). A vizsgálat során a quantitatív T2 relaxációs időt pixelenként meghatároztuk.

Mérési protokoll

Az ADC másodlagos csökkenését vizsgáló kísérletünkben 5 Wistar patkányt vizsgáltunk. A vizsgálatban 1 órás MCAO-t követően 10-órás reperfúziós időszakot tanulmányoztunk. A kísérlet során egy 6-szeletes ADC vizsgálat, egy 6-szeletes T2-súlyozott felvétel és egy egyszeletes perfúzió súlyozott felvétel történt az MCAO előtt, az 1 órás MCAO végén, a reperfúzió első 30 percében, majd a reperfúzió minden órájának a végén.

Az **ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérlethez** 14 Wistar patkányt használtunk. Az állatokban az MCA-t 1 órára elzártuk, majd a reperfúzió tervezett idejétől függően az állatokat 3 csoportra osztottuk. Négy állatban (I. csoport) nem húztuk vissza a fonalat, vagyis nem történt reperfúzió, míg 5-5 patkányban 1 órás (II. csoport) és 10-órás reperfúzió (III. csoport) után fejeztük be a kísérletet. Az állatokat a kísérlet végén, rögtön az utolsó MR mérést követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az I. és II. csoportban egy-egy patkányt az analízisből kizártunk, mivel az agy eltávolítása során subarachnoidalis vérzést észleltünk.

Képanalízis

A quantitatív ADC és T2 térképeket, valamint a normalizált perfúzió súlyozott képeket Macintosh Power PC 7200/66 (Apple, Cupertino, CA, U.S.A.) számítógép segítségével dolgoztuk fel. A képanalízishez az IMAGE képanalizáló szoftwert (NIH, Bethesda, MD, U.S.A.) használtuk. Az ADC és T2 adatok feldolgozása 0.1 mm³ voxelekben, a perfúziós szignál intenzitás analízise 0.4 mm³ voxelekben történt.

Az ADC másodlagos csökkenését vizsgáló kísérletünkben az adatok értékeléséhez relatív ADC, relatív perfúziós szignál intenzitás és relatív T2 térképet készítettünk úgy, hogy az identikus pixelekben az ischaemia és a reperfúzió során mért értékeket az ischaemia előtti kontroll értékekhez hasonlítottuk, s azokat minden pixelben a kontroll, ischaemia előtti érték százalékában fejeztük ki. Az ischaemiás károsodást szenvedett területet az MCAO alatt és a károsodott területet a reperfúzió során a kontroll érték 80%-ánál kisebb relatív ADC értéket mutató pixelek összességeként határoztuk meg (ezt tekintettük a lézió jelzőjének). Azért a

80% relatív ADC értéket választottuk a károsodás/lézió jelzőjének, mert ez korrelált az ATP hiánnyal a permanens ischaemia akut fázisában (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). Az ischaemiát szenvedett féltekében a féltekei lézió térfogatát az ipszilaterális félteke térfogatának százalékában fejeztük ki.

Az ischaemiás időszak végén mért, 80% alatti relatív ADC értékkel jellemezhető pixeleket 3 csoportba soroltuk attól függően, hogy hogyan változott a relatív ADC érték a reperfúzió korai és későbbi szakaszában. Ez alapján a következő alcsoportokat képeztük:

- "helyreállt" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, s mindvégig ezen érték fölött maradt a reperfúzió későbbi időszakában is;
- "másodlagos rosszabbodást mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, de a reperfúzió későbbi időszakában ismét 80% alá csökkent;
- "javulást nem mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték mindvégig 80% alatt volt.

A relatív ADC értékek, a relatív T2 értékek és a relatív perfúziós szignál intenzitás értékek időbeli változását a fenti szöveti alcsoportokban (helyreállt szövet; másodlagos rosszabbodást mutató szövet; javulást nem mutató szövet) külön-külön vizsgáltuk.

Az ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérletünkben az adatok értékeléséhez relatív ADC és relatív perfúziós szignál intenzitás térképet készítettünk úgy, hogy az identikus pixelekben az ischaemia és a reperfúzió során mért értékeket az ischaemia előtti kontroll időszakban mért értékekhez hasonlítottuk, s azokat minden pixelben a kontroll, ischaemia előtti érték százalékában fejeztük ki. A relatív ADC térképeken a lézió területét minden szeleten több relatív ADC küszöbértéknél is meghatároztuk: a meghatározás során a relatív ADC küszöbértékeket 60-100% között 2%-onként módosítottuk. Az ischaemiát szenvedett féltekében a féltekei lézió térfogatát (a lézió területének összege az összes szeleten szorozva a szeletek távolságával) az ipszilaterális félteke térfogatának (a félteke területének összege az összes szeleten szorozva a szeletek távolságával) százalékában fejeztük ki. A féltekei lézió térfogatát különböző relatív ADC küszöbértékek mellett mindhárom csoportban meghatároztuk az 1 órás ischaemiás időszak végén, valamint a II. és III. csoportban az 1 órás, a III. csoportban a 10-órás reperfúzió végén is.

Biokémiai vizsgálatok az ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérletünkben

A patkányok agyát -20°C-os hidegkamrában távolítottuk el, s ugyanezen a hőmérsékleten 20 µm vastag metszeteket készítettünk kriosztát mikrotóm segítségével. Az ADC szeletekkel megegyező síkokból származó metszetekből ATP és glükóz térképet készítettünk biolumineszcenciás módszerrel (Kogure és Alonso, 1978; Paschen és mtsai., 1981). Az ATP meghatározásra szolgáló metszetekkel szomszédos koronális szeletekből szöveti pH térképet készítettünk umbelliferone fluoreszcenciás technikával (Csiba és mtsai., 1983). Az ATP térképeken a károsodott energiametabolizmus területét a kontralaterális félteke ATP koncentráció átlagához képest legalább 30%-kal csökkent ATP szint alapján határoztuk meg. A szöveti acidózist a 6.7 alatti pH értékként határoztuk meg. Ezek a küszöbértékek a kontroll félteke átlagértékénél 2 SD-vel csökkentett értéknek feleltek meg. A féltekei lézió térfogatát a csökkent ATP szint és a szöveti acidózis alapján is meghatároztuk: a féltekei lézió térfogatát (a lézió területének összege az összes szeleten szorozva a szeletek távolságával) az ipszilaterális félteke térfogatának (a félteke területének összege az összes szeleten szorozva a szeletek távolságával) százalékában fejeztük ki.

Az ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérletünkben a relatív ADC és a metabolikus paraméterek összehasonlítása során az MR felvételek és a szövettani metszetek különböző rétegvastagsága nem tette lehetővé a csökkent energiametabolizmust (csökkent ATP szintet) vagy a szöveti acidózist jelző relatív ADC küszöb pixel-alapú meghatározását. Ezért a relatív ADC küszöböt oly módon határoztuk meg, hogy a különböző relatív ADC értékek mellett meghatározott féltekei lézió térfogatokat egy relatív ADC (vízszintes tengely) – féltekei lézió térfogat (függőleges tengely) grafikonon ábrázoltuk, s ezen bejelöltük a csökkent ATP szint, illetve a szöveti acidózis alapján meghatározott féltekei lézió térfogatot (lásd alább, az eredményeknél).

Noha a relatív ADC küszöb pixel-alapú meghatározása nem volt lehetséges a jelenlegi tanulmányban, úgynevezett incidencia-térképeket alkottunk a csökkent ATP szint és a relatív ADC csökkenés alapján, hogy összehasonlíthassuk a különböző paraméterek alapján meghatározott féltekei léziók területi megoszlását. Az ATP csökkenés alapján és a (már a vizsgálatunk eredményeként kapott, s az ATP depléciót jól jelző) 77% alatti relatív ADC küszöb alapján meghatározott területeket egy reprezentatív agytérképen a caudatum-putamen szintjében minden egyes kísérletben körberajzoltuk, majd ezeket egymásra fektettük. Képanalizáló szoftver segítségével ezt követően ATP csökkenést jelző és 77% alatti relatív ADC incidencia térképet készítettünk úgy, hogy minden egyes pixelben meghatároztuk, hogy az állatok hány százalékában volt az adott pixelben abnormis érték.

Statisztikai analízis

Az összes adatot átlag±SD formájában adtuk meg.

Az ADC másodlagos csökkenését vizsgáló kísérletünkben a reperfúzió különböző időpontjaiban mért relatív ADC, féltekei lézió térfogat és relatív T2 értékeket az ischaemia végén mért értékekhez hasonlítottuk, melyhez páros t-próbát használtunk. A perfúziós szignál intenzitást is páros t-próbával hasonlítottuk össze, de ezt az értéket az MCAO és a reperfúzió alatt az ischaemia előtti kontroll időszakban mért értékhez hasonlítottuk.

A kísérlet különböző fázisaiban mért relatív ADC értékek alapján meghatározott különböző kimenetelű szöveti alcsoportok ("helyreállt" szövet vs "másodlagos rosszabbodást mutató" szövet vs "javulást nem mutató"szövet) közötti különbségeket ismételt méréses variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Amennyiben ez szignifikáns különbséget jelzett, a Scheffe post-hoc tesztet használtuk a szöveti alcsoportok értékeinek az egyes mérési időpontokban történő összehasonlításához. A p<0.05 értéket fogadtuk el szignifikánsnak. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Az **ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérletünkben** a féltekei lézió térfogat 3 csoport közötti összehasonlításához ANOVA-t (analysis of variance), majd Scheffe post-hoc tesztet használtunk. Az ipszilaterális féltekében az ATP csökkenés

alapján kijelölt területben meghatározott glükóz koncentrációt és az ellenoldali identikus területben mért glükóz koncentrációt páratlan t-teszttel hasonlítottuk össze. A relatív perfúziós szignál intenzitást az MCAO végén és a reperfúzió különböző időpontjaiban az ischaemiát megelőző kontroll időszakban mért értékhez hasonlítottuk, melyhez páros t-tesztet használtunk. A p<0.05 értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

3.1.3. Átmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NAD szintre egerekben

A rövid fokális cerebrális ischaemiát követő reperfúzió során jelentkező energiametabolizmus javulását, majd másodlagos károsodását vizsgálva felvetették, hogy a másodlagos ATP depléció hátterében a PARP enzim túlzott aktivációja miatti NAD felhasználás állna (Endres és mtsai., 1997). Ennek a kérdésnek a vizsgálata céljából 1 órás MCAO és 1 órás MCAO-t követő különböző reperfúziós időszakok végén vizsgáltuk egerekben az ischaemiát szenvedett agyszövet ATP és NAD tartalmát.

Állatok, állatkísérlet

A kísérletekhez 20-25 g C57 Black egereket (n=15) használtunk. Az állatokat 22°C hőmérsékleten tartottuk, a szobában 12 órás világos és sötét időszakok váltották egymást.

A kísérlethez használt egereket 1.5 % halotánt tartalmazó 70%:30% arányú N₂O:O₂ keverékkel altattuk. A belső hőmérsékletet rektális hőmérővel monitoroztuk és feed-back fűtő pad segítségével az állatok testhőmérsékletét 37°C körül tartottuk. A fokális cerebrális ischaemiát a bal MCA elzárásával hoztuk létre, melyhez szilikonnal (Xantopren; Bayer Dental, Osaka Japan) 0.15-0.20 mm-re megvastagított végű sebészi fonalat (8-0 nylon Ethilon; Ethicon, Norderstedt, Németország) használtunk (Hata és mtsai., 1998). A műtét során átmenetileg egy mikrovaszkuláris klipet helyeztünk az a. carotis internára. Az a. carotis communis leklipelése és az a. carotis externa lekötése és átvágása, majd mobilizálása után egy, az a. carotis externán ejtett metszésen keresztül a fonalat az a. carotis internába vezettük. A metszéstől proximálisan az extrenát lekötve, az a. carotis communis klipet eltávolítottuk. Az a. cerebri media okklúzió tervezett időpontjában a fonalat az a. carotis communis bifurcatiotól 9 mm-re előretoltuk, mely az a. cerebri media okklúziót biztosította. Azokban az állatokban, melyekben átmeneti agyi ischaemia létrehozását terveztük, a megfelelő időtartam után a fonalat visszahúztuk, hogy az MCA reperfúzióját biztosítsuk. Az okklúzió sikerét és a reperfúzió mértékét az MCA ellátási területe fölé helyezett és a csonthoz rögzített lézer Doppler áramlásmérővel ellenőriztük. Egyórás MCAO-t követően, illetve 1, 3, 6, és 24 órás reperfúzió után az állatokat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk (Pontén és mtsai., 1973).

Biokémiai analízis

Az egerek agyát -20°C-os hidegkamrában távolítottuk el, s ugyanezen a hőmérsékleten az egerek agyát 20 µm vastag metszetekre vágtuk kriosztát mikrotóm segítségével. A szeletekből ATP biolumineszcenciás meghatározással ATP tartalmat, míg a szövetblokk felszínéről fluoreszcenciás módszerrel NADH tartalmat vizsgáltunk. Emellett ugyancsak mínusz 20°C-on szövetmintát vettünk a jobb és bal MCA ellátási területéről adenilát (ATP, ADP, AMP) és NAD meghatározásra.

Az ATP meghatározást a -20°C-on kriosztát mikrotómmal készített szeleteken vizsgáltuk biolumineszcens technikával (Paschen, 1990). Ehhez a fagyasztott szeleteket mínusz 20°C-on szárítottuk, majd a szöveti enzimeket 95°C-on inaktiváltuk. Ezt követően az agyszeleteket 60 µm vastag, luciferázt és luciferint tartalmazó fagyasztott enzim-blokkal fedtük, mely az ATP-specifikus biolumineszcenciás reakcióhoz volt szükséges. Ezután a metszetet 22°C-ra melegítettük, melyen az ATP-specifikus biolumineszcencia kialakult, melyet CCD kamerával (Sensicam; TILL Photonics, Planegg, Németország) rögzítettünk.

A NADH fluoreszcenciát a szövetblokk felszínéről végeztük, miután az ATP meghatározáshoz kriosztát mikrotómmal 20 µm vastag szeletet vágtunk. A szövetblokkot úgy helyeztük folyékony nitrogénbe, hogy a vizsgálandó felszín a nitrogénből kiállt. A felszínt egy megfelelő szűrőt használva 370 nm UV fénnyel megvilágítottuk. A fluoreszcens fényt, szintén szűrő segítségével 450 nm-en detektáltuk és CCD kamerával (Sensicam) rögzítettük.

Az adenin nukleotidok és NAD meghatározáshoz félretett szövetmintákat perklórsavval extraháltuk. A mintákhoz 20-40 μL 1% sósavat tartalmazó metanolt adtunk mínusz 20°C-on. Homogenizálás után az adenilátokat és a NAD-ot perklórsavval (0.7 M, 1mM EGTA-val kiegészítve) kétszer extraháltuk. Centrifugálás után az extraktumot KOH/KCl (3 M/0.5 M) oldattal semlegesítettük, majd -80°C-on tároltuk. A minta protein tartalmának meghatározására a perklórsavas precipitátumot 1 M NaOH-ban oldottuk és a fehérjetartalmat Lowry és mtsai. (1951) módszerével határoztuk meg, standardként marha serum albumint használva.

A NAD szintet a Nisselbaum és Green (1969) által leírt enzimatikus láncreakció segítségével mértük, 100 mM nikotinamidot, 500 mM etanolt, 0.89 mM fenazin-metosulfátot és 0.32 mM 3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromidot tartalmazó HEPES pufferben (100mM, pH 7.4). A fenti oldat 1.1 mL-éhez NAD standardot (15-150 μ M koncentrációkban), vagy agyszövet extraktumot adva, a reakciót alkohol dehidrogenáz (30 ug, 300-500 U/mg) hozzáadásával indítottuk. Tíz percig tartó, 37°C-on történő inkubációt követően a rekcióterméket 556 nm-en fotométerrel mértük. Az agyszövet NAD szintjét a NAD standardok alapján meghatározott grafikon alapján számoltuk.

Az agyszövet extraktum ATP, ADP és AMP koncentrációját HPLC-vel (Kontron Instruments, Neufahrn, Németország) mértük a Djuricic és mtsai. (1994) által korábban leírtak alapján. A szöveti extraktumot reverz-fázisú HPLC oszlopra vittük (ODS-3, 4.6x250mm, részecske méret 5 um; CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Németország). Az elválasztást egyenletesen változó metanol grádiens segítségével értük el. A mennyiségi analízis a 259 nm-en leolvasott, külső standard oldat használatával megrajzolt abszorbancia grafikon alapján történt. Az adenilát energiatartalom meghatározása az Atkinson (1968) által leírt egyenlet segítségével történt: ([ATP]+0.5[ADP])/([ATP]+ [ADP]+ [AMP]).

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag±SD formájában adtuk meg. A statisztikai analízishez ANOVA-t, majd Fisher PLSD post-hoc tesztet használtunk. Az adenilát metabolitok és a NAD szint két félteke közötti különbségének értékelésekor a p<0.05 szintet fogadtuk el szignifikánsnak.

3.2. HUMÁN TANULMÁNYAINKBA BEVONT ÖNKÉNTESEK ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Humán vizsgálatainkat minden esetben a megfelelő etikai bizottságok (Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága, illetve Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság) engedélyével végeztük. Az önkénteseket mindig részletesen tájékoztattuk a kísérleti eljárásokról és a vizsgálat lehetséges kockázatairól, és minden önkéntes a tájékoztatást követően írásban beleegyezését adta a vizsgálat elvégzéséhez. Mivel a fenti engedélyek beszerzése, és az önkéntesek tájékoztatása s beleegyezése a vizsgálatokba minden esetben megtörtént, ezt az egyes vizsgálatoknál külön nem említem.

A résztvevőket minden vizsgálatunkban szűrtük a cerebrovaszkuláris rizikófaktorok szempontjából: a magas vérnyomás, elhízás cukorbetegség, rendszeres alkoholfogyasztás, hyperlipidaemia (teljes koleszterin szint, LDL, triglicerid), coronaria vagy perifériás artériás megbetegedés kizáró kritériumként szerepelt. A vizsgálatba bevont személyek gyógyszert rendszeresen nem szedtek. A protokoll teljes neurológiai vizsgálatot, arteria carotis és arteria vertebralis duplex ultrahang vizsgálatot, transcranialis Dopplert és rutin klinikai laboratóriumi tesztet (szérumionok, vér urea nitrogén, kreatinin, éhgyomri cukor, májenzimek, kreatin-kináz, hemosztázis vizsgálatok, szérum lipidek és gyulladásos markerek, kapilláris vérgázok és pH) foglalt magában. A vérvétel éhgyomorra történt a vizsgálat napján reggel 8 és 10 óra között. A vizsgálati helyiség hőmérséklete 22-23°C volt. Mivel a fenti vizsgálatok és körülmények minden tanulmányban megtörténtek, illetve teljesültek, ezeket sem említem az egyes vizsgálatok módszereinél.

3.2.1. Az akut alkoholfogyasztás hatása az agyi hemodinamikai változásokra egészséges személyekben ortosztatikus stressz során

A tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy egészséges személyekben a hanyatt fekvő helyzetben mért hemodinamikai paraméterek (vérnyomás, szívfrekvencia, agyi véráramlási sebesség az MCA-ban, s a cerebrovaszkuláris rezisztencia) hogyan változtak a dönthető asztallal kivitelezett 70 fokos szögben történő 10 perces állítás (head-up tilt fázis; HUT fázis) hatására alkoholfogyasztás előtt és azt követően 1 órával.

Személyek és vizsgálatok

Húsz egészséges, fiatal egyetemi hallgatót (11 férfi, 9 nő, átlagéletkor: 23 ± 2 év, testtömeg index: $23,3 \pm 3,5$ kg/m²) vontunk be a vizsgálatba, akik alkoholt csak alkalomszerűen fogyasztottak (a rendszeres alkoholfogyasztás kizáró tényező volt), s a vizsgálat előtt legalább 24 órával nem ittak alkoholos italt. Az önkéntesek nem dohányoztak, s kórtörténetükben nem szerepelt syncope vagy légúti megbetegedés. Az önkénteseket arra kértük, hogy a vizsgálat napján tartózkodjanak a megerőltető testmozgástól, ne fogyasszanak kávét, vagy egyéb koffeintartalmú italt a vizsgálat előtti 12 órában, valamint ne étkezzenek a kísérletet megelőző 6 órában.

A résztvevők a nap ugyanazon szakában (16 és 19 óra között) head-up-tilt (HUT) teszten estek át. A vizsgálat során nem-invazív módon folyamatosan monitoroztuk a hemodinamikai paramétereket, mint a szívfrekvenciát (HR), szisztolés vérnyomást (sBP), diasztolés vérnyomást (dBP) és az artériás középvérnyomást (mBP). A fenti hemodinamikai

paraméterek folyamatos követéséhez Task-Force Monitort (CN Systems Medizintechnik GmbH, Graz, Ausztria) használtunk, amely elektrokardiográfot, illetve oscillometriára és folyamatos vérnyomásmérésre alkalmas készüléket foglal magában. Az MCA-ban folyó vér áramlási paramétereit a Task-Force Monitorhoz csatlakoztatott transcranialis Doppler segítségével (Multidop T2, DWL, Überlingen, Németország) folyamatosan rögzítettük mindkét oldalon. A véráramlási paraméterek detektálására mindkét temporalis csontablak fölé egy 2 MHz-es TCD monitorozó szondát rögzítettünk egy állítható fejpánt segítségével. Az erek megtalálásához és azonosításához Fujioka és Donville (1992) transztemporális megközelítésének leírását követtük, az áramlási értékeket 50 mm mélyen 10 mm hosszúságú mintatérfogat alkalmazásával vizsgáltuk.

A fentieken túl meghatároztuk a cerebrovaszkuláris rezisztencia indexet (CVRi), melyet az MCA szintjére számított arteriás középvérnyomás (mBPMCA) és az átlagos áramlási sebesség (MFVMCA) hányadosaként kaptunk: CVRi = mBPMCA / MFVMCA (Aaslid és mtsai., 1989; Tiecks és mtsai., 1995; Jacob és mtsai. 1999, Hughson és mtsai., 2001). Ahhoz, hogy a HUT fázis során az MCA szintjében mérhető arteriás középvérnyomást megkapjuk, a közel függőleges helyzetbe állított önkéntesekben a szív magasságában mért mBP érték korrekciójára volt szükség, ugyanis álló helyzetben a szív magasságában mért szisztémás arteriás középvérnyomás a hidrosztatikai nyomásnak köszönhetően nagyobb, mint a magasabban lévő, MCA szintjében detektálható nyomás (Ishibashi és mtsai., 2005). A számítás során tekintetbe vettük a szív és a temporalis csontablak (MCA szint) közötti távolság függőleges összetevőjét, és az MCA szintjében a hidrosztatikai nyomásból adódó csökkenés mértékét Hgmm-ben fejeztük ki. Miután az önkénteseket a HUT fázisban 70°-os szögben állítottuk, a következő egyenletet alkalmaztuk: gvér g h 1 sin 70 = gHg g h 2, ahol gvérés oHg a vér és a higany sűrűsége, g a gravitációs állandó, h1 a szív és a tempralis csontablak (TCD szonda) közötti távolság és h2 azon higanyoszlop magassága, ami ellensúlyozza a h1·sin70° véroszlop magasságát. Az MCA szintjében mérhető nyomást úgy kaptuk, hogy a szisztémás arteriás középvérnyomásból levontuk a h2 értéket.

Kísérleti protokoll

Először minden önkéntes hanyatt feküdt egy elektromos meghajtású, lábtartóval felszerelt dönthető asztalon. A megfelelő helyzet felvételét követően a szükséges mérőeszközöket (3 elvezetéses EKG, vérnyomásmérő, TCD szondák) a résztvevőkre rögzítettük. A kísérleti protokoll (**9.a ábra**) egy 30 perces nyugalmi fázist (az önkéntesek hanyatt feküdtek) és egy 10 perces HUT fázist (a résztvevőket 70 fokos szögben felállítottuk) foglalt magában a kontroll periódusban (alkoholfogyasztást megelőzően) és a teszt periódusban (alkoholfogyasztást követően) egyaránt. A vizsgálat alatt a résztvevőket egy biztonsági öv segítségével lazán a dönthető asztalhoz rögzítettük. A kontroll periódust követően az önkénteseket arra kértük, hogy a kimért alkohol mennyiséget (vodka, 37,5% alkoholtartalom) 10 perc alatt fogyasszák el. A résztvevők a vodkát cukor-, koffein- és szénsavmentes itallal hígíthatták legfeljebb 200 ml térfogatig. A teljes folyadékbevitel minden egyes résztvevő esetében 200 ml volt. Célunk az enyhe-közepes ittasságnak a hemodinamikai paraméterekre gyakorolt hatásainak vizsgálata volt, így az elérni kívánt véralkohol szint 100 mg/dl (1 g/l = 0.1 g/dl, vagyis 1.0‰) volt. Annak érdekében, hogy ezt a koncentrációt minél kisebb szórással érhessük el, a következő formulát használtuk a szükséges, grammban

kifejezett alkoholmennyiség kiszámításához: BAC·BW·WF, ahol BAC jelenti az elérni kívánt véralkohol koncentrációt ‰-ben vagy g/l-ben kifejezve, a BW a testsúly kg-ban, és a WF a Widmark-faktor, mely férfiak esetén 0,68, nők esetében 0,55 (Widmark, 1932).



9. ábra. Kísérleti protokoll.

a: A kísérleti protokoll 30 perces hanyatt fekvő nyugalmi, és 10 perces HUT fázist tartalmazott mind a kontroll periódusban, alkoholfogyasztás előtt, mind a teszt periódusban, alkoholfogyasztás után. A kontroll méréseket követően az önkéntesek 10 perc alatt előre kiszámított mennyiségű alkoholt fogyasztottak. A 10 perces ivási periódus során és további 30 percig a résztvevők ültek, ezután újra elhelyezkedtek a dönthető asztalon hanyatt fekvő helyzetben, és ugyanazt a protokollt hajtottuk végre, mint alkoholfogyasztás előtt. **b:** a szívfrekvencia, a szisztémás artériás középvérnyomás (mBP) és a bal oldali MCA átlagos áramlási sebessége (MFV_{MCA}) HUT teszt során ugyanazon önkéntes esetében alkoholbevitel előtt és után. A függőleges pontozott vonalak mutatják a 70 fokos döntés és a hanyatt fekvő helyzetbe történő visszafektetés időpontját. Az ábra azt demonstrálja, hogy alkoholfogyasztást követően a HUT teszt alatt a szívfrekvencia kifejezettebb növekedése ellenére kevésbé nőtt az artériás középvérnyomás és szignifikánsan nagyobb csökkenés jelentkezett az MCA áramlási sebességben, mint a kontroll periódusban, alkoholfogyasztás előtt.

A 10 perces ivási periódus alatt és további 30 percig az önkéntesek ültek, majd ismét elhelyezkedtek a dönthető asztalon hanyatt fekvő helyzetben, és ugyanazt a protokollt hajtottuk végre, mint alkoholfogyasztás előtt, vagyis 30 perc hanyatt fekvő helyzetet követően 10 perces HUT tesztet végeztünk. Mindez azt jelenti, hogy 1 óra telt el az alkoholbevitel befejezése és a közel függőleges pozícióba döntés kezdete között. Az alkoholfogyasztást követő periódusban végzett 10 perces HUT teszt után vért vettünk a véralkohol koncentráció és a vérgáz értékek meghatározása céljából. Az alkohol csak enyhe fokú intoxikációt okozott; minden önkéntes képes volt járni a vizsgálat befejezését követően, bár részletes vizsgálattal enyhe koordinációs zavarok kimutathatók voltak. Egy önkéntes sem mutatott pre-syncope jeleket (hányinger, izzadás, homályos vagy csőlátás, végtagi vagy általános gyengeség) a HUT fázis során, sem alkoholfogyasztás előtt, sem azután.

A vizsgálat alatt folyamatosan rögzítettük a szívfrekvenciát, a vérnyomásértékeket és az áramlási sebességet mindkét MCA-ban. A beat-to-beat adatokat külön átlagoltuk a hanyatt fekvő helyzetet jelentő nyugalmi fázis utolsó 5 percében (kiindulási érték) és a HUT fázis utolsó 9 percében mind a kontroll periódusban, alkoholfogyasztás előtt, mind a teszt periódusban, alkoholfogyasztás után. A HUT fázis első percéből származó adatokat nem használtuk fel az értékeléshez, mert a fiziológiai változók a közel függőleges helyzet felvételét követő első percben instabilak voltak. A **9.b ábra** mutatja a szívfrekvencia, a szisztémás artériás középvérnyomás és a bal MCA-ban mért átlagos áramlási sebesség változásait a HUT teszt során ugyanabban az önkéntesben alkoholfogyasztás előtt és után.

Statisztikai analízis

Mivel a változók nem voltak normális eloszlásúak, az értékeket median, minimum és maximum értékek formájában adtuk meg, s a statisztikai analízis során a nem-paraméteres Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát alkalmaztuk mind a hanyatt fekvő és HUT pozícióban mért, mind az alkoholfogyasztás előtt és után regisztrált adatpárok összehasonlítására. A hemodinamikai paraméterek ortosztatikus stressz (HUT teszt) által indukált relatív változásait a kiindulási érték százalékában fejeztük ki a következő képlet alkalmazásával: százalékos változás = [(érték HUT pozícióban– érték fekvő pozícióban / érték fekvő pozícióban] x 100.

A hemodinamikai paraméterek HUT teszt által alkoholfogyasztás előtt és után okozott relatív változásait szintén a Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával hasonlítottuk össze. A p<0.05 értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

3.2.2. A dohányzás és a dohányzás elhagyásának hatása a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási válaszra

Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a dohányzás károsítja-e a vizuális stimuláció és a következményes occipitális kérgi aktiváció kiváltotta vérátáramlás növekedéshez, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolathoz szükséges vazodilatációt, s ha igen, akkor ez a károsodás reverzibilis-e a dohányzás elhagyása után. Ehhez először legalább 3 éve dohányzókban, illetve nem dohányosokban vizsgáltuk a neurovaszkuláris kapcsolatot, majd olyan önkénteseket kerestünk, akik több mint 6 hónappal, de kevesebb mint 18 hónappal a vizsgálat előtt abbahagyták a dohányzást. A korábbi dohányosokban mért vizuális stimuláció indukálta vazoreaktivitást nem dohányzó és permanensen dohányzó önkéntesek adataival hasonlítottuk össze.

Személyek és vizsgálatok

Harminckét fiatal, 18-38 év közötti egészséges, rendszeres gyógyszeres kezelésben nem részesülő önkéntest vontunk be a vizsgálatba (16 dohányos, 16 nem dohányos; 8 férfi, 8 nő mindkét csoportban). Tanulmányunkban olyan dohányosokat vizsgáltunk, akik már legalább 3 éve legalább napi 15 cigarettát szívtak. A nem dohányosok közé olyan egyéneket válogattunk, akik sem passzív, sem aktív módon nem dohányoztak.

A dohányzás elhagyásának hatását vizsgáló tanulmányunkba 15 permanens dohányost, 15 kontroll személyt, valamint 15 korábbi dohányost válogattunk be. A dohányosok ebben a vizsgálatban is legalább 3 éve legalább napi 15 cigarettát szívtak, míg a korábbi dohányosok közé olyan önkénteseket kerestünk, akik a fenti kritériumnak megfeleltek (legalább 3 éven át legalább napi 15 szál cigarettát szívtak), de a vizsgálat előtt több mint 6 hónappal és kevesebb mint 18 hónappal teljesen abbahagyták a dohányzást.

A szokásos rutin vérvételen, belgyógyászati és neurológiai vizsgálaton, valamint a nyaki erek duplex ultrahangvizsgálatán túl mindkét oldalon meghatároztuk az arteria carotis communisban mérhető intima-media vastagságot (IMT). Az IMT vizsgálatához SONOS 4500 (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A.) ultrahangkészüléket és 7.5-MHz lineáris transducert használtunk. Az IMT mérés az a. carotis communis távoli falán történt, a carotis bulbustól 10 mm-re proximálisan, miközben a vizsgálati alany a fejét 45 fokkal az ellenkező irányba fordította. A méréseket kinagyított álló képen vizsgáltuk a végdiasztolés fázisban. A mérés során 10 mm-es szegmentet vizsgáltunk, s az IMT értékeket 1 mm-es távolságokban határoztuk meg mindkét oldalon, majd az így kapott 11+11 érték átlagát vettük.

Funkcionális transzkraniális Doppler (fTCD) vizsgálat a vizuális stimuláció (olvasás) hatásának a vizsgálatára

A funkcionális TCD teszteket reggel 7 és 8 óra között végeztük egy csendes szobában, miközben a vizsgálati alanyok egy kényelmes fotelben ültek. Az önkénteseket arra kértük, hogy a vizsgálat előtti napon 22 óra után és a vizsgálat napján kerüljék a dohányzást és a kávéfogyasztást. A vérnyomást a TCD vizsgálat előtt és azt követően nem-invazív módon mértük. Az ultrahangvizsgálatokat mindig ugyanaz a személy végezte, aki nem ismerte az önkéntesek dohányzási szokásait. A vérvételek a TCD vizsgálatok után történtek.

Funkcionális transzkraniális Doppler (fTCD) vizsgálat leírása

A látókéreg aktivációjának eredményeként az arteria cerebri posteriorban (PCA) bekövetkezett áramlási sebesség változását TCD-vel vizsgáltuk (Multidop T2, DWL, Überlingen, Németország).

A vizsgálat kezdetén 2 MHz-es transzkraniális szondát rögzítettünk mindkét oldalon egy fejpánt segítségével úgy, hogy a temporális csontablakon át az arteria cerebri posterior P2 szegmensében tudjuk a véráramlási paramétereket regisztrálni. Ehhez a vizsgálati mélységet 58-60 mm-re állítottuk, s a szondától távolodó irányú áramlást kerestünk. Amennyiben a fenti paramétereknek megfelelő, erős szignált sikerült detektálni, s az áramlási sebesség az arteria cerebri posteriorra jellemzően szemnyitásra nőtt, szemcsukásra csökkent, a szondát rögzítettük.

A vizsgálataink során a csúcs-szisztolés, az átlag- és a végdiasztolés sebességet regisztráltuk. Mivel a Doppler műtermékek a csúcs-szisztolés sebességet befolyásolják a legkevésbé (Rosengarten és mtsai., 2001a) a vizsgálatok értékelésekor ezt a paramétert használtuk. A funkcionális Doppler vizsgálathoz vizuális stimulációként egy érzelmileg semleges szöveget tartalmazó könyv hangtalan olvasására kértük az önkénteseket. Ezt az úgynevezett "olvasási tesztet" korábban sakktáblaminta stimulációval összehasonlították és validálták (Rosengarten és mtsai., 2001b). A vizsgálat során az önkéntesek 20 másodpercig a szeműket csukva tartották (nyugalmi fázis), majd kinyitották és 40 másodpercig olvastak (stimulációs fázis). Ezt az 1-perces ciklust 10 alkalommal megismételtük, s az 1-perces ciklusok megfelelő sebességértékeit minden személyben átlagoltuk (Vascochecker software; DWL, Sipplingen, Germany). Az átlagoláshoz a vizsgálat során nyert beat-to-beat áramlási sebességértékeket lineáris interpolációt követően 50 ms-os időközökben elmentettük (**10. ábra**), később az adatokat másodpercenkénti felbontásban ábrázoltuk. Mivel a jobb és bal oldali értékek között nem volt szignifikáns különbség, így az értékelés során egy személyen belül a két oldal értékeinek átlagával számoltunk.



10. ábra A mintavételezés 50 ms-onként történt. Ennek során az analízishez használt beat-tobeat csúcs-szisztolés értékeket egy program egy idő-áramlási sebesség grafikonon virtuálisan összekötötte (vastag, fekete vonal), s ezen a folytonos vonalon megjelenő értékeket rögzítettük 50 ms-onként. Az így kalkulált adatokat használtuk a 10 ciklus megfelelő időszakaiban mért áramlási sebességértékek átlagolásához.

Látó személyekben a szemek zárásakor a látókéreg deaktiválódik, s ennek hatására az arteria cerebri posteriorban mérhető áramlási sebesség csökken, majd egy alapszinten stabilizálódik. Szemnyitás után az áramlási sebesség emelkedik, maximumát elérve enyhén csökken, majd egy a maximálisnál alacsonyabb, de az alapértéknél magasabb szinten stabilizálódik (**11. ábra**).



11. ábra A neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálata. A vizsgálat során a vizsgált személy 20 másodpercig a szemeit csukva tartotta (nyugalmi fázis), majd szemnyitást követően 40 másodpercig hangtalanul olvasott (stimulációs fázis). A nyugalmi és stimulációs fázis végét egy hangstimulus jelezte. A fenti ciklust tízszer ismételtük, s az átlagolt értékeket elemeztük. Az aktuális csúcs-szisztolés áramlási sebességet a szemcsukás (kontroll periódus) utolsó 5 másodpercében mért nyugalmi csúcs-szisztolés sebességhez (alap) viszonyítottuk, s annak százalékos értékében adtuk meg (relatív áramlási sebesség).

Azért, hogy az egyes személyek adatait összehasonlíthassuk, az abszolút sebesség mellett meghatároztuk a relatív áramlási sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális abszolút áramlási sebességet a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért nyugalmi áramlási sebességhez viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki. A maximális relatív áramlási sebességnövekedés meghatározásához (vmax) az olvasás során, vagyis a stimulációs fázisban mért legmagasabb relatív áramlási sebességet használtuk. Azért, hogy a stabilizáció utáni adatokat értékelhessük, a relatív áramlási sebességet a stimulációs fázisban a stimuláció utáni 30. és 40. másodpercek között is átlagoltuk (vplateau).

VEP vizsgálat

A fentieken túl a dohányzás elhagyásának hatását vizsgáló tanulmányunkban a fTCD mellett vizuális kiváltott válasz (VEP) vizsgálatok is történtek a látókéreg aktivitásának becslésére (Neuropack; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan). A VEP vizsgálat során a két szemet külön-külön ingereltük, miközben mindkét occipitális régióról elvezettük a kiváltott válaszpotenciálokat. A fotelben ülő vizsgálati személy előtt egy méter távolságra egy sakktábla mintát ábrázoló képernyő volt, melyen a fehér és fekete négyzetek váltakoztak (mintaváltás). A mintaváltással történő ingerlés során nyerhető válasz a P100-as csúcs, melynek a polaritása pozitív, a latenciája kb. 100 ms. Tanulmányunkban a P100-as csúcs reprodukálhatóságát, amplitudóját és latenciáját mértük (Di Russo és mtsai., 2002; Odom és mtsai., 2004). A vizuális kiváltott válasz vizsgálat minden esetben a fTCD vizsgálat után fél órán belül megtörtént.

Légzésvisszatartás teszt

A dohányzás elhagyásának hatását vizsgáló tanulmányunkban a fentieken túl légzésvisszatartás tesztet is néztünk. Ennek során az MCA-ban mérhető áramlási sebességet detektáltuk, miközben a vizsgált személy hanyatt feküdt és szemeit csukva tartotta. Arra kértük a vizsgálatban részt vevő önkénteseket, hogy egy mély belégzést követően tartsák vissza a lélegzetüket olyan sokáig, ameddig csak bírják. Az áramlási sebességet rögzített szondával, a TCD transducer elmozdítása nélkül detektáltuk, s a lélegzetvisszatartás előtt (Vbaseline) és annak a végén (Vend) az átlagos áramlási sebességet feljegyeztük. A BHI (breath-holding index) értéket az átlagos áramlási sebesség százalékos emelkedése és a lélegzetvisszatartási idő hányadosa alapján számoltuk (Markus és Harrison, 1992; Silvestrini és mtsai., 2000). A vizsgálat során a kilégzésvégi szén-dioxidot, a szisztolés és diasztolés vérnyomást és a szívfrekvenciát is monitoroztuk. A BHI értéket a jobb és bal oldalon is meghatároztuk, s két perc elteltével a vizsgálatot megismételtük. A két oldal értékét és a két mérés során kapott értékeket is átlagoltuk, tehát a statisztikai analízis során minden vizsgálati alanyban egy BHI értékkel számoltunk.

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag±szórás (SD) formájában tüntettük fel. A varianciák homogenitását F teszttel ellenőriztük. A folyamatos változók eloszlásának vizsgálatához a Saphiro-Wilk tesztet használtuk. Egy személyen belül a jobb és bal oldalon kapott értékeket átlagoltuk. A dohányosok és nem-dohányosok, illetve a dohányosok, nem dohányosok és korábbi dohányosok adatainak az összehasonlításához normális eloszlás esetén variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk és statisztikailag szignifikáns eltérés esetén a Scheffe post-hoc tesztet használtuk. Nem-normális eloszlás esetén a Mann-Whitney U tesztet használtuk. A különböző csoportokban (dohányos versus nem dohányos, illetve dohányos versus nem dohányos versus korábbi dohányos) mért, vizuális inger kiváltotta abszolút és relatív véráramlási sebesség időbeli változásait ismételt méréses variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Az ismételt méréses variancia-analízis eredményeit a csoport-főhatás (group main effect) és a változások csoportonkénti időbeli lefolyása (group with time-of-measurement interaction) adta. A csoport-főhatás azt mutatta meg, hogy a 40 másodperces aktív (olvasási) periódusra átlagolva volt-e szignifikáns különbség az áramlási sebességekben a vizsgálati csoportok között. Az áramlási sebességváltozások csoportonkénti időbeli lefolyása azt jelezte, hogy az áramlási sebesség változásai időben különböztek-e az egyes csoportokban/kísérleti protokollokban. A szignifikáns csoportonkénti időbeli változás arra utalt, hogy az áramlási sebességváltozások időbeli lefolyása különbözött az egyes csoportokban (az időbeli lefolyást mutató grafikonok alakja eltért egymástól), míg a nem szignifikáns csoportonkénti időbeli változás azt jelezte, hogy az áramlási sebességváltozások hasonlóak voltak (az időbeli lefolyást mutató grafikonok alakja hasonlított, a grafikonok közel parallel lefutást mutattak). Az eltérést p<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

3.2.3. Az acetazolamid kiváltotta vazodilatáció hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Az acetazolamid neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatásának vizsgálatakor arra voltunk kíváncsiak, hogy az acetazolamid maximális hatásának idején, amikor az agyi rezisztenciaerek jelentősen kitágulnak, a neurovaszkuláris kapcsolat során megfigyelhető-e további vazodilatáció.

Személyek és vizsgálatok

A vizsgálatba 10 egészséges, 20-45 év közötti életkorú személyt vontunk be. A vizsgálatokat a reggeli órákban végeztük, miközben a vizsgálati alanyok egy kényelmes fotelben ültek. Minden önkéntest arra kértünk, hogy a vizsgálatot megelőző éjjel és a vizsgálat reggelén ne fogyasszanak kávét, teát, vagy energiaitalt. A vérnyomást és a pulzust neminvazív módon mértük a TCD vizsgálat előtt, az AZ beadás előtt és után, valamint a kísérlet végén.

Funkcionális Doppler vizsgálat (fTCD teszt)

Vizsgálatainkban minden önkéntes, egészséges egyén esetében két alkalommal végeztünk funkcionális TCD tesztet a vizuális stimuláció (olvasás) hatásának a vizsgálatára: az egyik vizsgálatot az acetazolamid adás előtt, a másikat utána. A módszert korábban, a dohányzás hatását vizsgáló tanulmányunk módszertani részénél a 3.2.2. fejezetben részletesen ismertettük, ezért itt csak röviden szólunk róla.

A vizsgálat során mindkét oldalon 2 MHz-es transzkraniális szonda segítségével az arteria cerebri posterior P2 szegmensében regisztráltuk a véráramlási paramétereket. A funkcionális Doppler vizsgálathoz vizuális stimulációként egy érzelmileg semleges szöveget tartalmazó könyv hangtalan olvasására kértük az önkénteseket. A vizsgálat során az önkéntesek 20 másodpercig a szeműket csukva tartották (nyugalmi fázis), majd kinyitották és 40 másodpercig olvastak (stimulációs fázis). Ezt az egy perces ciklust 10 alkalommal megismételtük, s a csúcs-szisztolés sebességértékeket minden személyben átlagoltuk, s az adatokat másodpercenkénti felbontásban ábrázoltuk. Az értékelés során a két oldal értékeinek átlagával számoltunk. Az egyes személyek adatainak összehasonlíthatósága céljából, az abszolút sebesség mellett meghatároztuk a relatív áramlási sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális abszolút áramlási sebességhez viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki. A maximális relatív áramlási sebességnövekedés meghatározásához a szemnyitás és olvasás során, vagyis a stimulációs fázisban mért legmagasabb relatív áramlási sebességet használtuk.

Az összehasonlíthatóság miatt nemcsak a fTCD teszt során használtuk a csúcsszisztolés sebességeket, hanem az acetazolamid kiváltotta vazoreaktivitás meghatározásakor is. Mivel a kísérlet során két fTCD tesztet végeztünk, két nyugalmi áramlási sebességet határoztunk meg, az egyiket az AZ adás előtt (BLelőtt), a másikat az AZ adás után (BLután), s a relatív áramlási sebességértékeket az egyes fTCD tesztek során a megfelelő nyugalmi abszolút áramlási sebességértékek százalékában fejeztük ki. Ennek megfelelően a maximális relatív áramlási sebességnövekedés mértékét is külön-külön meghatároztuk mindkét fTCD teszt során.

A vizsgálat során nemcsak az áramlási sebességet regisztráltuk, de folyamatosan mértük a cerebrovaszkuláris rezisztencia jellemzésére szolgáló pulzatilitási indexet (PI) is,

melyet a következő formula alapján számoltuk: PI = (csúcs-szisztolés áramlási sebesség – végdiasztolés áramlási sebesség) / átlagsebesség (Lindegaard és mtsai., 1985).

A statisztikai analízis során az acetazolamid hatás vizsgálatához a nyugalmi fázis végén, a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért csúcs-szisztolés sebesség és pulzatilitási értékeket használtuk.

Kísérleti protokoll

A TCD szondák rögzítését követően a nyugalmi áramlási paramétereket rögzítettük. Ezt követően elvégeztük az első fTCD tesztet, majd 15 mg/kg AZ intravénás beadására került sor (**12. ábra**). A második fTCD tesztet 10 perccel az AZ beadása után indítottuk.

Statisztikai módszerek

Az adatokat átlag±szórás (SD) formájában tüntettük fel. A kétoldali mérések adatait egy személyen belül átlagoltuk. A varianciák homogenitását F teszttel ellenőriztük. Az acetazolamid adás előtt és után a stimulációs időszakban mért abszolút és relatív áramlási sebességek változását ismételt méréses variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Az acetazolamid adás előtti és utáni nyugalmi csúcs-szisztolés áramlási sebességek (BLelőtt versus BLután), a maximális relatív áramlási sebességnövekedés értékek és a pulzatilitási indexek összehasonlításához páros t-próbát használtunk. Ugyancsak páros t-próbát alkalmaztunk a kísérlet különböző időpontjaiban mért vérnyomás és a pulzus összehasonlítására. Az eltérést p<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak.



12. ábra Kísérleti protokoll. A TCD szondák megfelelő pozícióban történő rögzítése után, a nyugalmi áramlási paramétereket rögzítettük. A vizuális stimuláció hatására a PCA-ban kialakuló áramlási sebességváltozást és a PI változását 15 mg/kg AZ adása előtt és után is meghatároztuk. Az AZ adása utáni vizsgálatot 10 perccel az acetazolamid adása után kezdtük, amikor az AZ maximális vazodilatátor hatása érvényesült. A vizsgálati személyek a szeműket a vizsgálat során végig csukva tartották, kivéve a vizuális stimuláció időszakát.

3.2.4. A hiperventiláció kiváltotta hipokapnia és NSAID készítmények hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

A hipokapnia hatását elemző tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a hiperventiláció kiváltotta hipokapnia és a következményes alkalózis, mint erős vazokonstriktor tényező, gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialkulásához szükséges vazodilatációt, vagyis esetünkben mérsékli-e a vizuális stimuláció kiváltotta áramlásváltozást a PCA-ban. Mint ismert, az indometacin ugyancsak vazokonstriktor tulajdonsággal bír, s NSAID lévén gátolja a neurovaszkuláris kapcsolat kialkulásában szerepet játszó ciklo-oxigenázt. Az NSAID neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatásának a vizsgálatakor arra voltunk kíváncsiak, hogy az indometacin és egy másik nem-szelektív NSAID, az ugyancsak széles körben használt, de kevésbé vizsgált naproxen befolyásolja-e a neuronális aktiváció indukálta áramlási választ a PCA-ban.

Vizsgálati személyek és alapvizsgálatok

A hipokapnia hatásának a vizsgálatához 14 (7 férfi és 7 nő), az NSAID hatás tanulmányozásához 15 (8 férfi és 7 nő) fiatal (20 és 35 év közötti), egészséges, rendszeres gyógyszeres kezelésben nem részesülő önkéntest vontunk be (az átlagéletkor mindkét vizsgálatban 25±4 év volt).

A hipokapnia hatásának vizsgálatát célzó kísérletben a vérgáz értékeket a hipokapnia előtt és azt követően is meghatároztuk (pO₂, pCO₂, pH, O₂ szaturáció).

Vizsgálataink funkcionális transzkcraniális Doppler (fTCD) és vizuális kiváltott válasz (VEP) vizsgálatokon alapultak, mely vizsgálatokat a normoventiláció és a hiperventiláció alatt is elvégeztük. A látókéreg funkciójának a vizsgálatára és a neuronális aktiváció mértékének a becslésére VEP vizsgálatot (Neuropack készülék, Nihon Kohden Corp., Tokió, Japán) végeztünk a fTCD tesztet követően hasonló feltételek mellett, mint amelyek a TCD vizsgálat során fennálltak. Az egyetlen különbség a fTCD és a VEP vizsgálat során az volt, hogy míg a fTCD teszt alatt az önkéntesek olvastak, addig a VEP vizsgálat során sakktábla mintát alkalmazva, mintaváltással történt az ingerlés.

Funkcionális transzkraniális Doppler (fTCD) vizsgálat a vizuális stimuláció (olvasás) hatásának a vizsgálatára

A vizsgálatokat a reggeli órákban végeztük, miközben a vizsgálati alanyok egy kényelmes fotelben ültek. Minden önkéntest arra kértünk, hogy a vizsgálatot megelőző éjjel és a vizsgálat reggelén ne fogyasszanak kávét, teát, vagy energiaitalt. A vérnyomást és a pulzust nem-invazív módon mértük a funkcionális TCD vizsgálat előtt és után.

Funkcionális Doppler vizsgálat (fTCD teszt)

A módszert korábban, a dohányzás hatását vizsgáló tanulmányunk módszertani részénél a 3.2.2. fejezetben részletesen ismertettük, ezért itt csak röviden szólunk róla. A vizsgálat során mindkét oldalon az arteria cerebri posterior P2 szegmensében TCD segítségével regisztráltuk a véráramlási paramétereket. A funkcionális Doppler vizsgálathoz vizuális stimulációként egy érzelmileg semleges szöveget tartalmazó könyv hangtalan olvasására kértük az önkénteseket. A vizsgálati személyek protokoll szerint 20 másodpercig a szeműket csukva tartották (nyugalmi fázis), majd kinyitották és 40 másodpercig olvastak (stimulációs fázis). Ezt az egy perces ciklust 10 alkalommal megismételtük, s a sebességértékeket minden személyben átlagoltuk, s az adatokat másodpercenkénti felbontásban ábrázoltuk. Az értékelés során a két oldal értékeinek átlagával számoltunk.

A hipokapnia előtti és utáni, illetve a gyógyszermentes és NSAID kezelés utáni PCA áramlási adatok összehasonlítása céljából az abszolút sebességértékek mellett meghatároztuk a relatív áramlási sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális abszolút áramlási sebességet a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért abszolút nyugalmi áramlási sebességhez viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki. A maximális relatív áramlási sebességnövekedés meghatározásához a szemnyitás és olvasás során, vagyis a stimulációs fázisban mért legmagasabb relatív áramlási sebességet használtuk.

Mivel mind a hipokapnia, mind az NSAID hatás vizsgálatakor több fTCD tesztet végeztünk (lásd: kísérleti protokoll), minden egyes fTCD teszt esetén külön meghatároztuk a nyugalmi áramlási sebességet, s a relatív áramlási sebességértékeket az egyes fTCD tesztek során a megfelelő nyugalmi abszolút áramlási sebességértékek százalékában fejeztük ki. Ennek megfelelően a maximális relatív áramlási sebességnövekedés mértékét is külön-külön meghatároztuk minden fTCD teszt során.

A vizsgálat során az áramlási sebességértékek mellett meghatároztuk a cerebrovaszkuláris rezisztencia jellemzésére szolgáló pulzatilitási indexet (PI) is (Lindegaard és mtsai., 1985). A statisztikai analízis során a nem-steroid gyulladásgátlók és a hiperventiláció pulzatilitási indexre gyakorolt hatásának a vizsgálatához a nyugalmi fázis végén, a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért PI-et használtuk.

Vizuális kiváltott válasz (VEP) vizsgálat

A VEP vizsgálat során a két szemet külön-külön ingereltük, miközben mindkét occipitális régióról elvezettük a kiváltott válaszpotenciálokat. A vizsgálat részletes leírása a dohányzás hatását vizsgáló tanulmányunk módszertani részében, a 3.2.2. fejezetben szerepel. Tanulmányunkban a P100-as csúcs amplitudóját és latenciáját mértük. A VEP vizsgálat minden esetben a fTCD teszt után fél órán belül megtörtént.

Egyéb vizsgálatok

A hipokapnia hatását vizsgáló kísérletünkben a hiperventiláció hatásosságának ellenőrzésére a kilégzésvégi szén-dioxid (etCO₂) szintet kapnográf segítségével mértük (Capnograd, Novametrix Medical Systems Corp., Wallingford, USA), emellett a kapilláris vérgáz szinteket szintén ellenőriztük a hiperventilációs fázis előtt és közvetlenül utána.

Vizsgálati protokollok

A hipokapnia (respirációs alkalózis) indukálta vazokonstrikció neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatását tanulmányozó vizsgálataink során minden vizsgálati személyben két alkalommal végeztünk funkcionális TCD és VEP vizsgálatot. Először normál légzésszám mellett (normoventiláció) határoztuk meg a vizuális stimuláció kiváltotta véráramlási sebességváltozást a PCA-ban és végeztünk VEP vizsgálatot, majd ugyanazon vizsgálati személyt percenként 35-40 légvételre kértünk öt percen át (hiperventilációs fázis). A hiperventiláció (HV) mellékhatásaként szédülés, fejfájás jelentkezett, ennek minimalizárására a HV alatt a fTCD vizsgálat során az 1 perces ciklusokat (20 másodperc szemzárás – 40 másodperc olvasás) nem a standard 10, hanem csupán 4 alkalommal ismételtük. A hiperventiláció során az adatgyűjtést kb. egy perccel az erőltetett légzés megkezdése után kezdtük el, amikor a kapnográf segítségével mért kilégzésvégi etCO₂ szint 25 Hgmm körül stabilizálódott. Ennek értelmében az 5-perces HV alatt minden vizsgálati személyben összesen 4 ciklust mértünk és átlagoltunk. Fontos megjegyezni, hogy a normoventiláció és hiperventiláció alatt a TCD szondák pozíciója változatlan maradt. A VEP vizsgálatot természetesen normoventiláció és hiperventiláció során is elvégeztük (**13. ábra**).



13. ábra. Vizsgálati protokoll a hipokapnia neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatását tanulmányozó vizsgálatunkban.

A nem-steroid gyulladásgátlók (indometacin és naproxen) hatását tanulmányozó vizsgálataink során minden önkéntesben három alkalommal végeztünk funkcionális TCD és VEP vizsgálatot. Először kontroll vizsgálat során határoztuk meg a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási sebességváltozást és végeztünk VEP vizsgálatot (kontroll fázis), majd a vizsgálati személy 2 egymást követő napon, napi 3-szor 25 mg indometacint vett be, melyet követően a funkcionális TCD és VEP vizsgálatokat megismételtük (indometacin fázis). Négy héttel később 2 egymást követő napon, napi kétszer 550 mg naproxen bevétele után a vizsgálatokat újból elvégezttük (naproxen fázis) (**14. ábra**).

Kontroll fázis	<u>s Ir</u>	ndometacin fa	ázis	Naproxen fázis		
•fTCD	3x25 mg	•fTCD		2x550 mg	•fTCD	
•VEP	indometacin	•VEP	4 hét	naproxen	•VEP	
	(2 nap)			(2 nap)		

14. ábra. Vizsgálati protokoll a nem-steroid gyulladásgátlók (indometacin és naproxen vs gyógyszermentes állapot) neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatását tanulmányozó vizsgálatunkban.

Statisztikai módszerek

Az adatokat átlag±szórás (SD) formájában tüntettük fel. A varianciák homogenitását F teszttel ellenőriztük. A normoventiláció és hiperventilció fázisában mért vizuális inger kiváltotta abszolút és relatív véráramlási sebességváltozásokat ismételt méréses varianciaanalízissel hasonlítottuk össze. Ugyancsak ismételt méréses variancia-analízist használtunk az NSAID hatás vizsgálatakor a gyógyszermentes, indometacin és naproxen fázisokban regisztrált olvasás kiváltotta abszolút és relatív véráramlási sebességváltozások összevetésére. Mind a hipokapnia, mind az NSAID hatás vizsgálatakor az egyes fázisokban mért pulzus, szisztolés és diasztolés vérnyomás, légzési frekvencia, vérgáz szintek, a nyugalmi fázis alatt mért agyi véráramlási sebesség és pulzatilitási index (PI), a maximális relatív áramlási sebesség, valamint a VEP vizsgálat során kapott P100 hullám latencia és amplitúdó értékek összehasonlítására páros t-próbát alkalmaztunk. Az eltérést p<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

3.2.5. Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza nyomtatott szöveg, illetve Braille írás olvasásának a hatására

Az elmúlt 3 évtizedben igazolták, hogy vakokban Braille írás olvasása során aktiválódik a látókéreg, s ennek következtében az aktivált területben nő a regionális vérátáramlás, azonban az áramlási válasz intenzitása és időbeli lefolyása nem volt ismert a látókhoz képest. Arra kerestünk választ, hogy TCD-vel kimutatható-e a vakokban Braille írás olvasásakor áramlási sebességváltozás a PCA-ban, és ha igen, akkor milyen ennek a változásnak a mértéke és dinamikája a látókban mért értékekhez képest.

Személyek

Tizenegy egészséges kongenitális vagy korai vak felnőttet (8 férfi, 3 nő, átlagéletkor: 23 ± 5 év) és tíz korban és nemben egyező egészséges látó személyt (7 férfi, 3 nő, átlagéletkor: 22 ± 4 év) vontunk be a tanulmányba. A tanulmány protokollja teljes neurológiai vizsgálatot, arteria carotis és arteria vertebralis duplex vizsgálatot, transcranialis duplex vizsgálatot, valamint rutin klinikai laboratóriumi teszteket foglalt magában.

A vak személyek korai vakok voltak, akik vakon születtek, vagy látásukat 5 éves koruk előtt elvesztették. Vakságuk hátterében perifériás lézió állt (szembetegség/látóideg megbetegedés), de egyéb neurológiai kórjelük nem volt. A vakságot koraszülési retinopátia (8/11), kongenitális glaukóma (2/11) és elsődleges retina degeneráció (1/11) okozta. Egy vizsgálati alany kivételével a vizsgálatba bevont vakok mindannyian jobb kezesek voltak, bár 11-ből 8 személy mindkét kezét használta a Braille-olvasáshoz (a jobb mutatóujjukkal követték a sort és a bal mutatóujjukkal ismerték fel a Braille-jeleket). Egyik vak személynél sem volt fénylátás és a VEP vizsgálat sem jelzett detektálható hullámot. Minden vak résztvevő 6-8 éves kora között kezdte a Braille-olvasást és naponta legalább egy órát olvasott Braille írást. A látó személyek esetén az ép látást neurológiai és szemészeti vizsgálat igazolta, továbbá normális VEP paramétereik voltak. Minden látó jobbkezes volt. A neurológiai, szemészeti, carotis és arteria vertebralis duplex, valamint transzkraniális colorduplex képalkotó vizsgálat mellett minden résztvevő funkcionális TCD (fTCD) és vizuális kiváltott válasz (VEP) vizsgálaton esett át.

Funkcionális TCD vizsgálatok (fTCD teszt)

A fTCD teszt reggel, csendes helyiségben, kényelmes ülő helyzetben történt. Minden résztvevő egy éjszakán át tartózkodott a koffeinfogyasztástól. A TCD vizsgálatokat mindig ugyanaz a két vizsgáló végezte. A módszert korábban, a dohányzás hatását vizsgáló tanulmányunk módszertani részénél a 3.2.2. fejezetben részletesen ismertettük, ezért itt csak röviden szólunk róla.

A vizsgálat során mindkét oldalon a PCA P2 szegmensében TCD segítségével regisztráltuk a véráramlási paramétereket. Tekintve, hogy vakokban a szemnyitás-szemcsukás teszt nem segít annak meghatározásában, hogy valóban a PCA-t vizsgáljuk-e, a fTCD vizsgálat előtt mindkét PCA pozícióját és a vizsgálati mélységet transzkraniális duplex ultrahanggal ellenőriztük. A funkcionális Doppler vizsgálathoz vizuális stimulációként egy érzelmileg semleges szöveget tartalmazó könyv hangtalan olvasására kértük az önkénteseket. Természetesen a látók nyomtatott szöveget, míg a vak résztvevők Braille-szöveget olvastak a stimulációs fázisban. A nyomtatott és Braille-szövegek tartalmilag azonosak voltak. A vizsgálat alatt az önkéntesek 20 másodperces kontroll fázis után 40 másodpercig hangtalanul olvastak (stimulációs fázis). Ezt az egy perces ciklust 10 alkalommal megismételtük, s a PCAban mért csúcs-szisztolés sebességértékeket minden személyben átlagoltuk.

Azért, hogy az áramlási adatokat összehasonlíthassuk, az abszolút csúcs-szisztolés sebességértékek mellett meghatároztuk a relatív áramlási sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális abszolút áramlási sebességet a kontroll fázis utolsó 5 másodpercében mért abszolút áramlási sebességhez viszonyítottuk és annak százalékában fejeztük ki. A maximális relatív áramlási sebességnövekedés meghatározásához az olvasás során, vagyis a stimulációs fázisban mért legmagasabb relatív áramlási sebességet használtuk.

Kísérleti elrendezés

Az olvasás egy komplex stimulus: olvasáskor a betű- és szófelismerésen, vagyis a szorosan értelmezett olvasáson túl látókban fényre, vakokban pedig a kéz és ujj mozgatására, s a Braille jelek tapintására is szükség van. Ahhoz, hogy önmagában az olvasás (betű- és szófelismerés) hatását is vizsgálhassuk, mind a vakok, mind a látók csoportjában két különböző kísérleti protokollt használtunk, melyekkel a fényinger illetve az ujjmozgás/tapintás, mint stimulus hatását semlegesíteni tudtuk (**15. ábra**).

A következő kísérleti elrendezéseket használtuk: Látó/Nyugalom-Olvasás Látó/NLC-Olvasás Vak/Nyugalom-Olvasás Vak/NLC-Olvasás

A kísérleti elrendezések elnevezése (**15. ábra**) két részből áll. A / jel előtti első rész a résztvevők csoportját ("Látó" vagy "Vak") mutatja. A / jel után a kísérleti elrendezést jelöltük: ebben a részben az első szó ("Nyugalom" vagy "NLC") a résztvevők aktivitására utal a 20 másodpercig tartó kontroll periódusban, míg a második szó a 40 másodperc időtartamú stimulációs periódus aktivitására vonatkozik (mindig "Olvasás"). A kontroll periódusban a "Nyugalom" szó arra utal, hogy az önkéntesek csukott szemmel ültek és nem csináltak semmit, míg az NLC fázisban nem-lexikális karaktereket (NLC) olvastak, vagy tapintottak.

A két kísérleti protokoll egyikében (Látó/Nyugalom-Olvasás protokoll) a látó alanyokat arra kértük, hogy csukják be a szemüket 20 másodpercre (kontroll fázis -Nyugalom), és közben ne csináljanak semmit, és ne gondoljanak semmire. Ezután a 20 másodperces periódus után kinyitották a szemüket, és egy emocionálisan semleges szöveget kellett csendben olvasniuk 40 másodpercig (stimulációs fázis - Olvasás). A másik kísérleti elrendezésben (Látó/NLC-Olvasás protokoll) a látó résztvevőket arra kértük, hogy nemlexikális karaktereket (NLC) "olvassanak" (nézzenek). A nem lexikális karakterek pontok, vesszők, pontosvesszők, kettőspontok és kötőjelek kombinációját (pl.:..,-.:,-) tartalmazták. A nem lexikális karakterek "olvasása" 20 másodpercig tartott (kontroll periódus – NLC), melyet követően egy emocionálisan semleges szöveget kellett csendben olvasniuk 40 másodpercig (stimulációs fázis - Olvasás). Természetesen a 20 másodperces kontroll és a 40 másodperces stimulációs fázisból álló 1 perces ciklust ugyanúgy 10 alkalommal ismételtük, mint a korábbi vizsgálatainkban, s a mért eredményeket átlagoltuk.



15. ábra Kísérleti elrendezés. Mindkét csoportban két kísérleti protokollt alkalmaztunk. Az egyik protokollban (Látó/Nyugalom-Olvasás; Vak/Nyugalom-Olvasás) a résztvevők csukott szemmel ültek, nem csináltak semmit, és nem gondoltak semmire a kontroll fázisban ("Nyugalom" fázis). A "Nyugalom" fázist követően a résztvevőket megkértük, hogy csendben olvassanak. Ebben a stimulációs fázisban a látó személyek nyomtatott szöveget, míg a vak személyek Braille-írást olvastak. A másik kísérleti protokollban (Látó/NLC-Olvasás; Vak/NLC-Olvasás) a látó és a vak résztvevők nem lexikális karaktereket (NLC) "olvastak" a kontroll fázisban: a látó személyek nyomtatott karaktereket néztek, míg a vak személyek nem lexikális karakterek Braille-jeleit tapintották. A kontroll periódus után a látó és a vak személyeket megkértük, hogy olvassanak nyomtatott, illetve Braille-szöveget. A kontroll és a stimulációs fázisok időtartama 20, illetve 40 másodperc volt. Ezt az egy perces ciklust 10 alkalommal ismételtük, majd a kapott áramlási paramétereket átlagoltuk.

A vak önkéntesek vizsgálatakor arra kértük a vizsgálati személyeket, hogy tartsák csukva a szemüket a kísérlet teljes hossza alatt. A vak résztvevőket a két kísérleti protokoll egyikében (Vak/Nyugalom-Olvasás protokoll) megkértük, hogy üljenek csukott szemmel, miközben ne csináljanak semmit, és ne gondoljanak semmire a 20 másodperces kontroll periódus során (Nyugalom). A kontroll periódust követő stimulációs fázis során egy emocionálisan semleges Braille-szöveget (tartalmilag ugyanazt, mint a látó alanyok) olvastak csendben 40 másodpercig (Braille olvasás). A másik protokollban (Vak/NLC-Olvasás protokoll) a vakokat arra kértük, hogy nem-lexikális karakterjeleket (NLC) "olvassanak" (tapintsanak), melyek pontok, vesszők, pontosvesszők, kettőspontok és kötőjelek

kombinációját tartalmazták (pl.:..,-.:,-.:...,). A 20 másodpercig tartó NLC fázist követően a stimulációs fázisban egy emocionálisan semleges Braille-szöveget olvastak csendben 40 másodpercig (Braille olvasás). A 20 másodperces kontroll és a 40 másodperces stimulációs fázisból álló 1 perces ciklust a vak önkéntesekben is 10 alkalommal ismételtük, s a mért értékeket átlagoltuk. A kontroll és a stimulációs fázisok közötti váltást mindig hangjelzéssel jeleztük.

Az önkéntesek felében a "Nyugalom-Olvasás" protokoll volt az első, melyet az "NLC-Olvasás" protokoll követett, míg a többi résztvevő esetében a két kísérleti elrendezést fordított sorrendben alkalmaztuk.

A "Nyugalom-Olvasás" protokoll (amikor a résztvevők a kontroll fázisban csukott szemmel ültek és nem csináltak semmit) stimulációs periódusában a látó személyek nyomtatott szöveget olvastak, miközben fénystimulus is érte őket (fénystimulus + nyomtatott szöveg olvasása), míg a vak személyek Braille írást olvastak és szükségszerűen mozgatták a kezüket és mutatóujjukat, hogy kövessék és tapintsák a Braille-jeleket (kéz/ujjmozgás + Braille-olvasás). Ez azt jelenti, hogy a stimulációs fázisban a betűk/szavak felismerése és a jelentéstartalommal bíró szöveg megértése mellett más ingerek is érték az önkénteseket: a látó személyeket fény, a vak személyeket a kéz és a mutatóuji mozgatása. A "Nyugalom-Olvasás" protokollal ellentétben az "NLC-Olvasás" elrendezésben a látó alanyok nem-lexikális karaktereket néztek, míg a vak résztvevők nem-lexikális Braille-jeleket követtek és tapintottak a kontroll periódusban ("NLC" fázis). Így csak a betű- és szófelismerés és a jelentéstartalommal bíró szöveg megértése volt új inger a stimulációs fázis során az "NLC-Olvasás" kísérleti elrendezésben. Ennek a két protokollnak a használata lehetővé tette számunkra, hogy külön-külön meghatározzuk a "fénystimulus + betű- és szófelismerés" és a "kéz/ujjmozgás + betű- és szófelismerés" kombinált hatását látó és vak személyekben ("Nyugalom-Olvasás" protokoll), valamint a "csak betű- és szófelismerés" hatását látó és vak önkéntesekben ("NLC-Olvasás" protokoll).

A PCA áramlási sebességváltozásainak rögzítését követően a TCD szondák pozícióját megváltoztattuk, hogy az MCA áramlási paramétereit tudjuk vizsgálni, és ugyanazokat a kísérleti protokollokat ismételtük meg, mint a PCA áramlási sebességének mérésénél. Az MCA áramlási sebességváltozások mérésére azért volt szükség, hogy a nem specifikus hatások (pl. vérnyomásváltozásból adódó változás) mértékét becsülni tudjuk.

Fél órával az fTCD vizsgálatot követően VEP vizsgálatot végeztünk az occipitalis kéreg felett (Neuropack, Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) és a vizsgálat után a P100 hullámok amplitúdóját és latenciaidejét meghatároztuk.

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag ± szórás (SD) formában fejeztük ki. Elsőként azt ellenőriztük, hogy az adatok normál eloszlást mutatnak-e, és az eltérések homogenitását F-próbával ellenőriztük. Mivel nem volt különbség a jobb és bal oldali PCA áramlási paraméterek között, a kétoldali mérések eredményeit egy személyen belül átlagoltuk. Ismételt méréses variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk, hogy összehasonlítsuk az agyi véráramlási sebességek abszolút és relatív változásait a stimulációs fázisban a vak és a látó csoport, valamint a különböző kísérleti elrendezések között. Az ismételt méréses variancia-analízis eredményeit a csoport-főhatás (group main effect) és a változások csoportonkénti időbeli lefolyása (group with time-of-measurement interaction) adta. A csoport-főhatás vizsgálata arra adott választ, hogy a 40 másodperces aktív (olvasási) periódusra átlagolva volt-e szignifikáns különbség az áramlási sebességekben a vak és a látó csoport, vagy a különböző kísérleti elrendezések között. Az áramlási sebességváltozások csoportonkénti időbeli lefolyása azt mutatta meg, hogy az áramlási sebesség változásai időben különböztek-e az egyes csoportokban, illetve az egyes kísérleti protokollokban.

A kor, szívritmus, vérnyomás, kapilláris vérgázok és pH, a kiindulási abszolút és a maximális relatív áramlási sebességértékek összehasonlítása a vak és a látó csoportokban variancia-analízissel és Scheffe post-hoc teszttel történt. Az azonos csoportból származó adatok közötti különbségeket kétmintás t-próbával vizsgáltuk. Ezt a statisztikai módszert akkor alkalmaztuk, ha a kísérlet különböző időpontjaiban (pl. kontroll fázis vs. stimulációs fázis), vagy a különböző kísérleti protokollok során (pl. "Nyugalom-Olvasás" vs. "NLC-Olvasás" protokollok) kapott értékeket hasonlítottuk össze egy csoporton belül. A p<0.05 értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEI

4.1.1. Az angiotenzin hatásának vizsgálata egerekben permanens agyi ischaemiában

Kísérletünkben 1 és 24 órás permanens MCAO során a protein szintézis és az energiametabolizmus alakulását vizsgáltuk angiotenzinogént fokozottan expresszáló, valamint angiotenzin-1A receptorhiányos transzgén egerekben és vad típusú társaikban. A fenti csoportokban meghatároztuk az ATP depléció alapján definiált infarktus méretét, valamint a gátolt protein szintézis és ATP depléció által kijelölt területek különbségéből becsülhető penumbra méretét. Annak vizsgálatára, hogy a vaszkuláris hatástól független tényező szerepet játszik-e az AT1 receptorhiányos állatokban az ischaemiás/hipoxiás károsodás kialakulásában, a transzgén és a kontroll állatokból származó, oxigén-glükóz deprivációnak kitett sejtkultúrákban in vitro is tanulmányoztuk a sejtkárosodás mértékét.

A magasabb angiotenzin (AII) szint hatása fokális cerebrális ischaemiában

Elsőként az emelkedett AII szint ischaemiás károsodásra kifejtett hatását vizsgáltuk 1 és 24 órás permanens MCAO után angiotenzinogent overexpresszáló egerekben és vad típusú társaikban. Az ischaemiás lézió nagyságát az ATP hiányos terület alapján, míg a penumbra méretét a gátolt cerebrális protein szintézis és az ATP hiányos terület különbségeként definiáltuk (**16. és 17. ábra**). Az angiotenzinogént overexpresszáló egerek kontrollját az ugyanabból az alomból származó, normális AII szinttel bíró vad típusú egerek képezték.



16. ábra Reprezentatív képek az agiontenzinogént overexpresszáló TGM123 (A ábrarész), valamint az AT1 receptorhiányos (AT1 KO) állatokban (B ábrarész) és vad típusú társaikban (WT) 1 órás permanens MCAO után. A cerebrális protein szintézist ábrázoló felvételeken (CPS) a gátolt protein szintézis és az ATP hiányos területek szuperpozíciója révén a penumbra mérete (nyíl) meghatározható volt. A TGM123 egerekben penumbra alig volt detektálható, míg az AT-1 receptorhiányos egerekben (AT1 KO) a penumbra méretét jelző gátolt protein szintézis – ATP hiány különbségeként meghatározott terület szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típusú állatokban (WT).



Az agyi véráramlást (CBF) az ischaemiás magban és a penumbrában is meghatároztuk ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiográfiás módszerrel (17.C ábra).

17. ábra Az ATP depléció (ATP) és a gátolt cerebrális protein szintézis (Protein szintézis) által meghatározott terület nagysága az ellenoldali félteke százalékában kifejezve 1 órás (A) és 24 órás (B) permanens MCAO után angiotenzinogént overexpresszáló TGM123 transzgén állatokban (Overexpression) és a kontrollként szolgáló vad típusú társaikban (Kontroll). A transzgén csoportban 1 órás ischaemiát követően a penumbra mérete szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll állatokban (A), azonban hasonló eltérés 24 órás ischaemia után nem volt megfigyelhető (B). Az ATP depléció által meghatározott infarktus mérete (ATP) 24 órás MCAO után nagyobb volt a transzgén csoportban a kontroll csoporthoz képest (B). A C ábrarész a regionális agyi véráramlást (CBF) mutatja az ischaemiás magban és a penumbrában 1 órás MCAO után, valamint a lézió területében 24 órás MCAO-t követően.

Bár a TGM123 angiotenzinogént overexpresszáló állatokban szignifikánsan magasabb artériás középnyomást mértünk (**3. táblázat, A rész**), az ATP hiány alapján meghatározott lézió mérete 1 órás MCAO után nem különbözött a vad típusú kontrollokban mért értékektől (**17. ábra**). Ugyanakkor, 1 órás MCAO után a penumbra mérete szignifikánsan kisebb volt a TGM123 angiotenzinogén overexpressziót mutató egerekben (az ellenoldali félteke méretének $2.2\pm0.8\%$ -a), mint a vad típusú kontroll állatokban (az ellenoldali félteke méretének $12.5\pm4.6\%$ -a; p<0.01). A 24 órás permanens MCAO után a penumbra mérete elhanyagolható volt mind az angiotenzinogén overexpressziót mutató egerekben ($1.2\%\pm1.7\%$), mind a vad típusú társaikban ($0.3\pm0.7\%$).

3. táblázat Élettani paraméterek transzgén és vad típusú egerekben 10 perccel az MCAO előtt (-10 min MCAO) és 10 perccel az MCAO után (+10 min MCAO) az 1 órás MCAO csoportban (1h group), valamint a 24 órás MCAO csoportban (24h group)

	<u>- 10min MCAO</u>		+10min MCAO/1h group		+10min MCAO/24h group	
Paraméterek	Vad típus	Transzgén	Vad típus	Transzgén	Vad típus	Transzgén
A) TGM 123/WT						
mBP (Hgmm)	88±7	103±5**	90±7	107±4**	84±3	104±10**
pO ₂ (Hgmm)	203±64	223±19	203±49	213±31	207±40	227±31
pCO ₂ (Hgmm)	40.7±2	43.2±6.6	37±5.8	42.3±2.2	43±2.6	44.6±3.6
рН	7.44 ± 0.06	7.42±0.02	7.47 ± 0.04	7.46 ± 0.03	7.45 ± 0.07	7.49 ± 0.06
Tömeg (g)			32.8±4.6	32.2±3.3	30±5	32.4±1.6
B) AT1 KO/WT	1	1			1	l .
mBP (Hgmm)	93±3	81±4**	94±4	80±5**	96±4	79±6**
pO ₂ (Hgmm)	162±36	162±34	162±36	152±10	151±30	160±22
pCO ₂ (Hgmm)	39.4±3.4	37.8±3.2	39±4.1	36±4.2	36±7.5	39.3±3.1
рН	7.40 ± 0.01	7.41±0.09	7.40±0.12	7.45 ± 0.03	7.40±0.13	7.48 ± 0.04
Tömeg (g)			20.8±2.6	20.4±2.8	21±1	21.5±0.6

A) Összehasonlítás az angiotenzinogént overexpresszáló egerek (TGM123) és azok azonos alomból származó vad típusú társai (WT) között; B) Összehasonlítás az angiotenzin II receptor 1-es típusának a hiányát mutató transzgén egerek (AT1 KO) és azok azonos alomból származó vad típusú társai (WT) között. **p<0.01.

Mivel az angiotenzin (AII) vazokonstriktor hatása jól ismert, megvizsgáltuk, hogy van-e hemodinamikai különbség a transzgén és a vad típusú egerek között. Mint az a **17.C ábrán** jól látható, 1 órás MCAO-t követően az ischaemiás magban a regionális agyi vérátáramlás szignifikánsan alacsonyabb volt a TGM 123 egerekben (3.8±1.7 mL/100g/min), mint a kontroll állatokban (7.6±2.7 mL/100 g/min; p<0.05). A penumbra régióban a véráramlás ugyancsak a TGM123 állatokban (23.0±5.3 mL/100g/min) volt alacsonyabb a vad típusú egerekhez képest (36.2±5.2 mL/100 g/min; p<0.01). A regionális véráramlás 24 órás MCAO után a lézió területében /lesion area (24h)/ mérve a TGM123 egerekben 2.9±2.7 mL/100g/min volt, míg a vad típusú egerekben 7.2±2.9 mL/100 g/min (p<0.02). Ahhoz, hogy az angiotenzinogént overexpresszáló állatokban észlelt súlyosabb ischaemiás károsodás hátterében a magasabb angiotenzin koncentráció okozta AT1 receptor up-, vagy downregulációját kizárjuk, az AT1 receptor mRNS koncentrációját in situ hibridizációs módszerrel megvizsgáltuk. A vizsgálat a transzgén és a vad típusú egerek között szignifikáns eltérést nem igazolt.

Az AT1 receptor (AT1R) jelentősége fokális cerebrális ischaemiában

Az előző kísérletek igazolták az angiotenzin (AII) káros szerepét cerebrális ischaemiában. Mivel az angiotenzin a hatását, legalábbis részben, az AT1 receptoron fejti ki, megvizsgáltuk, hogy AT1 receptorhiányos transzgén egerekben és vad típusú társaikban hogyan alakul az ischaemiás mag és a penumbra mérete permanens MCAO-ban. Szemben az angiotenzinogént overexpresszáló TGM123 egerekkel, az AT1 receptorhiányos állatokban az arteriás középvérnyomás alacsonyabb volt, mint a vad típusú társaikban (**3. táblázat, B rész**). Az ATP hiány alapján meghatározott ischaemiás lézió térfogata 1 órás MCAO után az AT1
receptorhiányos egerekben kisebb volt (az ellenoldali félteke 53.9±7.3%-a), mint a kontroll állatokban (az ellenoldali félteke 64.9±4.6%-a, p<0.05), míg a gátolt cerebrális protein szintézis területe nem különbözött a két csoport között. A penumbra mérete 1 órás MCAO után szignifikánsan nagyobb volt az AT1 receptorhiányos egerekben (14.7±4.1%), mint a kontrollokban (7.7±3.5%, p<0.05; **18. ábra**). Mivel a penumbra az idő elteltével bevonódik az ischaemiás mag területébe, a 24 órás MCAO után mindkét csoportban hasonlóan kisméretű volt a penumbra (AT1R hiányos egerek: 1.7±2.9%, vad típusú egerek: 0.5±0.4%). Egyórás MCAO után az AT1R hiányos egerekben nagyobb átlagos vérátáramlást mértünk, mint a vad típusú társaikban mind az ischaemiás magban [core (1h); AT1R hiányos egerek: 11.7±5.1 mL/100g/min vs. vad típus: 4.6±1.1 mL/100 g/min; p<0.05], mind a penumbrában [penumbra (1h); AT1R hiányos egerek: 31.0±3.0 mL/100g/min vs. vad típus: 24.6±3.1 mL/100 g/min; p<0.03]. A lézió területében mért vérátáramlás 24 órás MCAO-t követően hasonló volt az AT1R hiányos (6.0±2.6 mL/100g/min) és a kontroll egerekben (6.7±1.5 mL/100g/min).



18. ábra Az ATP depléció (ATP) és a gátolt cerebrális protein szintézis (Protein szintézis) által meghatározott terület nagysága az ellenoldali félteke százalékában kifejezve 1 órás (A) és 24 órás (B) permanens MCAO után AT1 receptorhiányos állatokban (AT1R Knock-out) és a kontrollként szolgáló vad típusú társaikban (Kontroll). A transzgén csoportban 1 órás ischaemiát követően a penumbra mérete szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll állatokban, azonban hasonló eltérés 24 órás ischaemia után nem volt megfigyelhető. A C ábrarész a regionális agyi vérátáramlást mutatja az ischaemiás magban és a penumbrában 1 órás MCAO után, valamint a lézió területében 24 órás MCAO-t követően.

Sem az angiotenzinogént overexpresszáló TGM123, sem az AT1 receptor hiányos transzgén egerekben nem különböztek az MCAO előtt és röviddel az MCAO után vizsgált vérgáz értékek a vad típusú társaikhoz képest (**3. táblázat**).

Ischaemia indukálta metabolikus eltérések

Pixel analízist használva a kettős autoradiográfiás jelöléssel készült CBF és CPS képek (CBF: agyi vérátáramlás és CPS: agyi protein szintézis) és az ATP biolumineszcenciás képek kombinálásával meghatározható az a véráramlási érték, mely érték alatt az energiametabolizmus és/vagy a cerebrális protein szintézis károsodik fokális cerebrális ischaemiában (Maeda és mtsai., 2000; Mies és mtsai., 1993; Mies és mtsai., 1991).

Egyórás MCAO során az ATP deplécióért, vagyis az energiametabolizmus zavaráért felelős CBF küszöbérték az angiotenzinogént overexpresszáló egerekben jelentősen magasabb volt (29±1 mL/100g/min), mint a vad típusú állatokban (20±6 mL/100g/min; p<0.05). Ez azt jelenti, hogy az angiotenzinogént overexpresszáló egerek érzékenyebbek az ischaemiára, hisz esetükben már magasabb vérátáramlási küszöbértéknél károsodott az energiametabolizmus, szemben a vad típusú társaikkal. Ugyankkor az agyi protein szintézis zavara az angiotenzinogén overexpressziót mutató egerekben és a kontroll állatokban nem különbözött számottevően (19.A ábra). Az angiotenzinogént overexpresszáló egerekkel szemben az AT1 receptorhiányos egerek kevésbé voltak érzékenyek az ischaemiára. Bár az energiametabolizmus zavarát okozó CBF küszöbérték az AT1 receptorhiányos egerekben (18±2 mL/100g/min) csak tendenciájában volt alacsonyabb, mint a kontroll állatokban (23±7 mL/100g/min), a protein szintézis gátlását előidéző CBF küszöb már szignifikánsan kisebb volt az AT1 receptorhiányos állatokban (34±6 mL/100g/min), mint a vad típusú egerekben (45±4 mL/100g/min; p<0.05). Mindez azt jelzi, hogy az AT1 receptorok hiánya az agyszövetet rezisztensebbé teszi az ischaemiával szemben a vad típusú kontroll állatokhoz képest (19.B ábra).

A neuronális AT1 receptor ischaemiás károsodásra gyakorolt hatásának in vitro vizsgálata

Vad típusú egerek kortikális neuronjaiból készített primer neuronális sejtkultúrában 120-perces oxigén-glükóz deprivációt követően jelentősen nőtt az LDH aktivitás, melynek mértéke a neuronális károsodás mértékét jelezte (**20. ábra**). Ezzel szemben, hasonló kísérleti körülmények között az AT1 receptorhiányos transzgén egerekből készített sejtkultúrában az LDH emelkedés szignifikánsan kisebb volt. Hasonlóan alacsonyabb volt a 120-perces oxigénglükóz depriváció kiváltotta LDH felszabadulás abban az esetben is, amikor a vad típusú állatokból származott sejtkultúrát 1 és 10 µM koncentrációban alkalmazott AT1 receptor blokkoló szerrel, nevezetesen losartannal előkezeltük.



19. ábra Az energiametabolizmus károsodásáért és a protein szintézis zavaráért felelős perfúziós küszöbértékek

Pixel analízist használva a kettős autoradiográfiás jelöléssel készült CBF és CPS képek (CBF: agyi vérátáramlás és CPS: agyi protein szintézis) és az ATP biolumineszcenciás képek (ATP) kombinálásával meghatározható az a vérátáramlási érték, mely érték alatt az energiametabolizmus és/vagy a cerebrális protein szintézis károsodik fokális cerebrális ischaemiában. A CBF küszöbérték meghatározása az ipszilaterális cortexben történt a következő módon: az ATP és CPS képeken a pixeleket 10 mL/100 g/min CBF alosztályonként meghatároztuk. A metabolikus károsodást jelző pixelek arányát (százalékát) minden áramlási alosztályban kiszámoltuk. Az ATP depléciót és a protein szintézis gátlását okozó CBF küszöbértéket annál az áramlási értéknél definiáltuk, melynél a pixelek 50%-ban volt metabolikus károsodás.

Az A ábrán a perfúziós küszöbértékek láthatók TGM123 angiotenzinogént overexpresszáló egerekben 1 órás MCAO során. Jól látható, hogy az ATP deplécióért felelős áramlási küszöbérték a mutáns egerekben lényegesen magasabb volt (29±1 mL/100g/min), mint a vad típusú társaikban (20±6 mL/100g/min; p<0.05), míg a protein szintézis gátlását okozó CBF küszöbben nem volt különbség a két csoport között (TGM123 állatok: 45±6 mL/100g/min, vad típusú egerek: 47±12 mL/100g/min). A **B** ábrán az látható, hogy a cerebrális protein szintézis gátlásáért felelős perfúziós küszöbérték az AT1 receptorhiányos egerekben egyórás MCAO során szignifikánsan alacsonyabb volt (34±6 mL/100g/min), mint a kontroll állatokban (45±5 mL/100g/min). Az ATP depléciót okozó CBF küszöbérték tendenciájában volt kisebb az AT1 receptorhiányos egerekben (18±2 mL/100g/min) a kontrollokhoz képest (23±7 mL/100g/min), de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.



20. ábra Kortikális neuronokból készített primer neuronális sejtkultúrában 120 perces oxigén-glükóz deprivációt (OGD) követően jelentkező LDH felszabadulás mértéke látható vad típusú (wt) és AT1 hiányos transzgén (AT1-KO) egerekben. A neuronális károsodás mértékét jelző LDH aktivitást a 2 órás oxigén-glükóz depriváció kezdetétől számított 24 óra múlva mértük.
A) Az oszlopok a sejtkultúra mediumában mérhető LDH felszabadulás mértékét jelzik a vad típusú (WT) és az AT1 hiányos állatokban (AT1-KO) kontroll körülmények között (Kontroll) és oxigén-glükóz deprivációt (OGD) követően (*p<0.001 versus OGD wt).

B) Az ábrarész az AT1 receptor 1 és 10 μ M losartannal történő blokkolás hatását mutatja az LDH felszabadulásra oxigén-glükóz deprivációt követően. A vad típusú egerekből származó, oxigén-glükóz deprivációnak kitett sejtkultúrát a kísérlet indítása előtt 1 órával vivőanyaggal, 1 μ M és 10 μ M losartannal előkezeltük. Összehasonlítás céljából az AT1 receptor hiányos transzgén egerekből származott sejtkultúrában észlelt, oxigén-glükóz depriváció kiváltotta LDH felszabadulást is ábrázoltuk vivőanyaggal történt előkezelés után (*p<0.001 versus OGD wt + vivőanyag). A kontroll LDH érték szintjét, melyet vivőanyaggal kezelt, de oxigén-glükóz deprivációnak ki nem tett sejtkultúrában mértünk, szaggatott vonal jelzi. Ezen kontroll LDH felszabadulást jelző aktivitás mértéke a vad típusú (58.0±2.1 U/mL) és az AT1 hiányos transzgén csoportban (52.4±2.8 U/mL) nem különbözött szignifikáns mértékben.

4.1.2. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatának vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában

Vizsgálataink célja az volt, hogy 1 órás fokális cerebrális ischaemiát követő reperfúzió során megvizsgáljuk az MR paraméterek változását a reperfúzió 10 órája alatt. Azt teszteltük, hogy kimutatható-e az ADC értékek normalizálódása a reperfúzió korai fázisában, s megjelenik-e az energiametabolizmus másodlagos károsodásához hasonlóan az ADC

másodlagos csökkenése a reperfúzió későbbi szakaszában. Egy másik kísérletben azt tanulmányoztuk, hogy 1 órás fokális cerebrális ischaemia után és az azt követő 1 órás és 10órás reperfúziós időszak végén milyen kapcsolat mutatható ki az ADC érték valamint a szöveti ATP tartalom és a szöveti pH között.

Az ADC érték másodlagos károsodásának vizsgálata 1 órás átmeneti agyi fokális cerebrális ischaemia során

Az ADC másodlagos csökkenését vizsgáló kísérletünk 3 fázisból állt: a kontroll fázisból, az 1 órás ischaemiás és a 10-órás reperfúziós fázisból. Az élettani paraméterek a kísérlet minden fázisában a normális határok között voltak (**4. táblázat**). A kísérlet hosszú idejére tekintettel fontosnak tartjuk hangsúlyozni, hogy a kísérlet végén mért glükóz (5.1±0.4 mmol/L) és hematokrit érték (43±1%) a hosszú anaesthesia és többszöri vérvétel ellenére nem tért el az élettani értéktől.

Kísérleti	mBP	pН	pCO ₂	pO ₂	Testhő
fázis	(Hgmm)		(Hgmm)	(Hgmm)	(0 C)
Kontroll	108±3	7.43±0.10	38.0±6.7	158.1±32.6	36.9±0.2
Ischaemia	108±3	7.43±0.01	35.8 ± 3.0	153.4 ± 27.0	36.8±0.2
Reperfúzió					
1 h	109±4	7.43 ± 0.08	41.6±11.1	147.8 ± 30.6	37.0±0.3
2 h	109±3	7.45 ± 0.09	36.5 ± 5.6	157.2±12.5	36.9±0.2
3 h	110±4	7.44 ± 0.07	40.2±3.1	153.3±18.3	37.0±0.2
4 h	109±3	7.42 ± 0.10	$40.4{\pm}10.7$	151.4±15.3	36.7±0.2
5 h	108±3	7.46±0.12	37.7±9.7	155.5±16.7	36.8±0.1
6 h	106±2	7.44 ± 0.09	39.3±3.1	157.0±18.7	37.1±0.5
7 h	108±4	7.45 ± 0.09	41.1±4.3	151.1±12.5	36.8±0.2
8 h	107±2	7.45±0.11	38.6±5.7	155±25.8	37.0±0.3
9 h	107±3	7.45 ± 0.11	39.4 ± 3.8	158.6±22.9	36.8±0.2
10 h	108±2	7.44±0.14	37.9 ± 7.1	153.0±9.9	37.0±0.2

4. táblázat A kísérlet különböző fázisaiban mért élettani paraméterek

Átlag±SD. Rövidítések magyarázata: mBP: artériás középvérnyomás, pCO₂: a CO₂ parciális nyomása, pO₂: az oxigén parciális nyomása

A **21. ábrán** egy típusos kísérlet MR vizsgálatának (ADC, T2 és perfúziós térkép) az eredményei láthatók az MCAO előtti kontroll fázisban (Kontroll), az ischaemia végén (MCAO) és a 10-órás reperfúziós időszak (Reperfúzió) különböző időpontjaiban.



21. ábra Az ADC, a T2 és a perfúziós szignál intenzitás térkép az ischaemiás fázis előtt (Kontroll), az 1 órás a. cerebri media okklúzió végén (MCAO) és a reperfúziós fázis különböző időpontjaiban (Reperfúzió). A reperfúzió korai szakaszában jól látható az ADC átmeneti normalizálódása, melyet egy másodlagos ADC csökkenés követ. Ezzel szemben a T2 térképek adatai a caudatum-putamen régiójában a T2 értékek folyamatos növekedését jelzik a reperfúzió minden szakaszában, beleértve a korai reperfúziós időszakot is. A perfúziós szignál intenzitás változása nem utalt szignifikáns hipoperfúzióra az a. cerebri mediát elzáró fonál visszahúzását, vagyis a reperfúzió indukcióját követően. Rövidítések magyarázata: PWI: perfúzió-súlyozott felvétel; ADC: apparent diffusion coefficient. a.u.: arbitrary unit.

Az ischaemiás területet az a. cerebri media okklúzió alatt és a károsodott területet a reperfúzió során a kontroll érték 80%-ánál kisebb relatív ADC értéket mutató pixelek összességeként határoztuk meg. A féltekei lézió térfogatát (hemispheric lesion volume: HLV) ezen pixelekből számoltuk, s azt az ipszilaterális félteke térfogatának százalékában fejeztük ki. Az ischaemiás időszak végén mért HLV ($22.3\pm9.0\%$) szignifikánsan csökkent a reperfúzió korai időszakában ($7.1\pm5.9\%$ 30 perccel, $6.4\pm5.7\%$ 1 órával és $7.9\pm7.0\%$ két órával a recirkuláció után), de ezt követően ismét nőtt, s a reperfúzió 10. órájára az ischaemia végén mért lézió méretét megközelítette ($17.3\pm9.3\%$; **22. ábra**).



22. ábra A féltekei lézió térfogata (HLV) az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós időszak különböző időpontjaiban. Megfigyelhető, hogy míg a reperfúzió korai szakaszában szignifikánsan csökkent a HLV, 2 órával a reperfúziót követően ez ismét növekedett, s a 7. órától már nem különbözött szignifikánsan az iscahemia végén mért HLV értékétől. Az SD vonalak pozitív ága fölötti jelzések az ischaemia végi (jelen esetben 0. órás) értékekhez képest jelölik a szignifikáns (*:p<0.05; **:p<0.01) illetve nem szignifikáns (NS) változásokat.

Az egyórás ischaemiás periódus végén a 80% alatti relatív ADC értékek alapján definiált ischaemiás lézió régiójában mért átlagos relatív ADC érték a reperfúzió első óráiban szignifikánsan javult, majd a recirkuláció 2. órája után ismét csökkent (**23. ábra**).



23. ábra Az ischaemia végén meghatározott lézió térfogatában mért átlagos relatív ADC időbeli változása a reperfúziós fázisban. A relatív ADC az ischaemia végén károsodott területben a recirkulációt követően szignifikánsan javult, majd a reperfúzió későbbi időszakában ismét rosszabbodott. Az SD vonalak pozitív ága fölötti jelzések az ischaemia végi (jelen esetben 0. órás) értékekhez képest jelölik a szignifikáns (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001) illetve nem szignifikáns (NS) változásokat.

Az egyórás ischaemiás periódus végén a 80% alatti relatív ADC értékekkel jellemezhető pixeleket 3 alcsoportba soroltuk attól függően, hogy az adott pixelben hogyan alakult a relatív ADC érték a reperfúzió első két órájában és a reperfúziós időszak végén. Ez alapján a következő alcsoportokat képesztük:

- "helyreállt" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, s mindvégig ezen érték fölött maradt a reperfúzió későbbi időszakában is;
- "másodlagos rosszabbodást mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, de a reperfúzió későbbi időszakában ismét 80% alá csökkent;
- "javulást nem mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték mindvégig 80% alatt volt.

Az ischaemia végén a 80% alatti relatív ADC értékekkel jellemezhető, vagyis az ischaemiás károsodást szenvedett régiót jelző pixelek 32.8±10.8%-a a "helyreállt", az 50.9±5.4%-a a "másodlagos rosszabbodást mutató", míg a 16.4±12.5%-a a "javulást nem mutató" szöveti alcsoportba volt besorolható. A fenti definíció alapján meghatározott alcsoportokban a relatív ADC időbeli változását az **24.A ábra** mutatja. Az ischaemia végén mért relatív ADC érték a "javulást nem mutató" pixelekben szignifikánsan rosszabb volt (az ischaemia előtti kontroll érték 57.4±3.8%-a), mint a "másodlagos rosszabbodást mutató" (a kontroll érték 66.3±3.4%-a), vagy a "helyreállt" szövetet jelképező (a kontroll érték 64.6±1.5%-a) pixelekben. Ugyanakkor a másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szövetet jelképező pixelekben az ischaemia végén mért relatív ADC érték nem különbözött szignifikánsan. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az ischaemia végén mért alacsony relatív ADC érték az ADC normalizálódás hiányát előrejelezheti, azonban nem képes a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szövet elkülönítésére.

A relatív T2 értékek a fenti meghatározás alapján képzett mindhárom szöveti alcsoportban enyhén emelkedettek voltak az egyórás ischaemiás időszak végén (**24.B ábra**). Bár az MCAO végén meghatározott relatív T2 érték valamivel magasabb volt a "javulást nem mutató" (105.7±4.0%) és a "másodlagos rosszabbodást mutató" csoportban (103.4±3.1%), mint a "helyreállt" szövetet jelképező pixelekben (101.5±2.2%), a különbség a Scheffe teszt alapján nem bizonyult szignifikánsnak. Az ischaemia végén meghatározott relatív T2 érték a reperfúzió során nemcsak a "javulást nem mutató", hanem a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben is folyamatosan emelkedett, azonban a "helyreállt" szövetet jelző pixelekben további relatív T2 növekedés nem volt. A relatív ADC és a relatív T2 értékek időbeli változását összehasonlítva a legszembetűnőbb különbség a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben volt: míg a relatív ADC érték ebben a szöveti alcsoportban átmenetileg javult a recirkuláció első óráiban, a relatív T2 érték folyamatosan nőtt a reperfúzió minden időszakában (**24.B ábra**).

A relatív perfúziós szignál intenzitás vizsgálata nem jelzett szignifikáns eltérést a 3 szöveti alcsoport között sem az ischaemia végén, sem a reperfúziós fázis egyes időpontjaiban (**24.C ábra**). Megjegyzendő, hogy bár a "javulást nem mutató" és a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben a reperfúzió első óráiban enyhe hiperperfúziót észleltünk, a perfúziós szignál intenzitás emelkedése az ischaemia előtti, kontroll perfúziós szignál intenzitás értékhez képest nem volt szignifikáns. Említést érdemel még, hogy a reperfúziós fázis későbbi szakaszában a perfúziós szignál intenzitás kissé a kontroll érték alá csökkent, a páros t-teszt vizsgálat nem igazolt szignifikáns hipoperfúziót az ischaemia előtti kontroll fázisban mért perfúziós értékhez képest.



24. ábra A relatív ADC, a relatív T2 és a relatív perfúziós szignál intenzitás időbeli változása a "helyreállt", a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "javulást nem mutató" alcsoportokban. Az ischaemia végén mért relatív ADC érték (A) szignifikánsan alacsonyabb volt a "javulást nem mutató" szöveti alcsoportban a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szöveti alcsoportban mért értékekhez képest (**p<0.01). Szembetűnő a relatív ADC és a relatív T2 érték különböző alakulása a reperfúzió korai fázisában a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben (A, B). A relatív T2 értékeket jelző diagrammon (B) a szignifikáns különbséget mutató jelzések (*:p<0.05; **:p<0.01) az ischaemia végén mért relatív T2 értékekhez képest jelölik a változásokat. A recirkuláció során egyik szöveti alcsoportban sem volt szignifikáns hipoperfúzió az ischaemia előtti kontroll perfúziós szignál intenzitás értékhez képest (C). A szaggatott vonalak az ischaemia előtti kontroll értékeket jelzik (100%). Az A diagrammon a léziót és a szöveti alcsoportokat meghatározó 80%-os relatív ADC értéket is szaggatott vonallal jelöltük.

Az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatának vizsgálata 1 órás MCAO-t követő különböző reperfúziós idők mellett

Az ATP hiány és ADC csökkenés közötti korrelációt vizsgáló kísérlethez 14 Wistar patkányt használtunk. Az állatokban az a. cerebri mediát 1 órára elzártuk (MCAO), majd a reperfúzió tervezett idejétől függően az állatokat 3 csoportra osztottuk. Négy állatban nem húztuk vissza a fonalat, vagyis nem történt reperfúzió az 1 órás a. cerebri media okklúzió

végén (I. csoport, No-r), míg 5-5 patkányban az egyórás ischaemiát követően 1 órás (II. csoport, 1h-r) és 10 órás reperfúzió (III. csoport, 10h-r) után fejeztük be a kísérletet. Az állatokat a kísérlet végén, rögtön az utolsó MR mérést követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk biokémiai vizsgálatok (ATP, pH, glükóz) céljából. Az I. és II. csoportban egy-egy patkányt az analízisből kizártunk, mivel az agyeltávolítás során subarachnoidalis vérzést észleltünk. Az adatok értékeléséhez relatív ADC és relatív perfúziós szignál intenzitás térképet készítettünk úgy, hogy az identikus pixelekben az ischaemia és a reperfúzió során mért értékeket az ischaemia előtti kontroll időszakban mért értékekhez hasonlítottuk, s azokat minden pixelben a kontroll, ischaemia előtti érték százalékában fejeztük ki.

Vérnyomás és vérgáz értékek

A vizsgálati időszakban a vérnyomás és a vérgáz értékek mindvégig az élettani határok között voltak (**5. táblázat**) és ezekben a paraméterekben sem a csoportok között, sem a különböző időpontokban nem volt szignifikáns különbség.

5. táblázat Vizsgálati paraméterek a különböző kísérleti csoportokban és kísérleti időszakokban. (Értelemszerűen a kontroll során és az 1 órás ischaemiás időszak végén mindhárom csoportban, az 1 órás reperfúzió végén a II. és III. csoportban, s a 10 órás reperfúzió végén a III. csoportban történtek a mérések.)

Csoport	Kísérleti fázis	mBP	pН	pCO ₂	pO ₂
		(Hgmm)		(Hgmm)	(Hgmm)
Nincs recirkuláció	Kontroll	111±4	7.417±0.098	37.8±4.8	142.2±21.0
	Ischaemia (1 h)	111±2	7.425±0.056	37.6±3.4	140.2 ± 19.8
1h recirkuláció	Kontroll	110±4	7.406±0.061	40.6±3.4	140.7 ± 15.2
	Ischaemia (1 h)	108±4	7.443±0.063	41.6±2.5	140.7 ± 19.0
	Reperfúzió (1 h)	107±5	7.434 ± 0.062	37.5±2.5	141.9±14.6
10h recirkuláció	Kontroll	108 ± 3	7.426 ± 0.095	38.0 ± 6.7	158.1 ± 32.6
	Ischaemia (1 h)	108 ± 3	7.434 ± 0.085	35.8 ± 3.0	153.4 ± 27.0
	Reperfúzió (1 h)	109 ± 4	7.430 ± 0.076	41.6 ± 11.1	147.8 ± 30.6
	Reperfúzió (10 h)	108 ± 2	7.442 ± 0.143	37.9 ± 7.1	153.0 ± 9.9

MCAO: arteria cerebri media okklúzió; mBP: arteriás közép-vérnyomás

Perfúzió súlyozott térkép, ADC

A **25. ábra** a három csoport egy-egy reprezentatív kísérletéből származó MR felvételeit és biokémiai térképeit mutatja. A vizsgálat befejezése előtti utolsó ADC kép és a megfelelő ATP térkép a két paraméter közötti szoros térbeli összefüggésre utal.



25. ábra Reprezentatív, koronális síkú ADC és perfúzió súlyozott felvételek és metabolikus térképek a patkány agy caudatum-putamen szintjéből egyórás a. cerebri media területi ischaemia és különböző időtartamú (1, 10 óra) reperfúzió végén. Az MR vizsgálatok az ischaemia előtt (Control) és az ischaemia végén (a. cerebri media okklúzió: MCAO) készültek az 1. állat esetében (No-r). További MR felvételek láthatók az 1 órás reperfúziós időszak végén /Rep. (1h)/ a 2. csoportbéli állat (1h-r), és az 1 /Rep. (1h)/ és 10 órás /Rep. (10h)/ reperfúziós időszak végén a 3. csoportból származó állat (10h-r) esetében. Emellett ATP, pH és glükóz térképeket készítettünk az MR felvételel megegyező síkokban az utolsó ADC felvétel és a metabolikus paraméterek összehasonlítása céljából. A 2. és 3. állat felvételein a korai reperfúziós fázisban jól megfigyelhető az ADC érték javulása, míg a 3. állatban a 10 órás recirkulációt követően készült ADC térkép az ADC késői csökkenését jelzi. A metabolikus paraméterek és a vizsgálat befejezése előtt készült MR felvételek összehasonlítása az utolsó ADC kép és az ATP térkép közötti szoros térbeli összefüggésre utal.

Az MCAO-t követően a relatív perfúziós szignál intenzitás az ipsilateralis félteke MCA által ellátott területében szignifikánsan csökkent (**6. táblázat**). Egyórás ischaemiát követően az MCAO-ért felelős fonalat a II. és III. csoport állataiban visszahúztuk, melyet követően ezekben a csoportokban a perfúziós szignál emelkedett, igazolva a sikeres recirkulációt.

		<u>Perfúziós szignál (az ischaemia előtti érték %-a)</u>				
Csoport	Vizsgált terület	Ischaemia (1h)	Reperfúzió (1h)	Reperfúzió (10h)		
Nincs recirkuláció	MCA területe	39.9±4.0 *	-	-		
	Cortex	38.8±3.7 *	-	-		
	Caudatum-Putamen	40.8±4.7 *	-	-		
1h recirkuláció	MCA terület	38.4±4.1 *	96.4±11.5	-		
	Cortex	36.6±3.3 *	89.3±14.8	-		
	Caudatum-Putamen	40.6±5.1 *	118.2±20.3	-		
10h rcirkuláció	MCA terület	36.3±8.4 *	103.6±15.6	92.5±19.4		
	Cortex	35.4±10.8 *	86.9±21.6	95.2±24.8		
	Caudatum-Putamen	36.5±4.3 *	123.8±14.3 †	88.6±17.5		

6. táblázat Relatív perfúziós szignál intenzitás a különböző kísérleti csoportokban és kísérleti időszakokban

A perfúziós szignál intenzitást az a. cerebri media ellátási területében vizsgáltuk (MCA terület), s külön meghatároztuk a perfúziós szignált a cortex és a caudatum-putamen területében is. Az a. cerebri media okklúzió (MCAO) során mindhárom kísérleti csoportban szignifikáns perfúziócsökkenés volt (*p<0.001) az a. cerebri media ellátási területében, mind a cortexeben, mind a caudatum-putamen régióban. A III. csoportban (10h recirkuláció) a korai reperfúziós fázisban a perfúziós szignál intenzitás a kontroll fázisban meghatározott értéket a caudatum-putamen területében szignifikánsan meghaladta (†: p<0.05).

Mind a II., mind a III. csoportban a caudatum-putamen szintjében enyhe hiperperfúziót figyeltünk meg. Bár a perfúziós szignál a III. csoportban az ischaemia előtti kontroll fázisban mért értékek alá csökkent a késői reperfúziós időszakban, a statisztikai analízis nem jelzett szignifikáns hipoperfúziót.

Az 1 órás MCAO végére az ADC érték szignifikánsan csökkent, azonban a korai reperfúziós időszakban ez az érték javult, majd a késői reperfúziós időszakban ismét rosszabbodott (csökkent). Bár az ischaemia végén észlelt ADC csökkenés nem volt homogén, mégis megfigyelhető volt, hogy az ADC fokozatosan csökkent a lézió széli része felől a lézió központja felé mindhárom csoportban. Az ADC érték ezen fokozatos változásának tudható be az, hogy a különböző relatív ADC küszöbértékek alapján definiált féltekei lézió térfogata a küszöbértékek növelésével párhuzamosan növekedett (**26. ábra**).

Az ADC csökkenés, az ATP hiány és a szöveti acidózis alapján meghatározott féltekei lézió térfogat (HLV)

Mindhárom csoportban a kísérlet befejezését (vagyis az állat folyékony nitrogénben történő fagyasztását) megelőzően készült utolsó ADC felvételt használva különböző relatív

ADC küszöbértékeknél meghatároztuk a féltekei lézió térfogatát, s ezt grafikonon ábrázoltuk (**26. ábra**).



26. ábra A különböző relatív ADC küszöbértékek alapján definiált féltekei lézió térfogat (HLV) grafikon és a grafikonba illesztett ATP hiányon és szöveti acidózison alapuló féltekei lézió térfogat az I. (Nincs recirkuláció), a II. (1h recirkuláció) és a III. (10h recirkuláció) csoportban. Ez az összehasonlítás tette lehetővé, hogy meghatározzuk az ATP hiányt és szöveti acidózist jelző relatív ADC küszöbértéket 1 órás MCAO és különböző időtartamú reperfúzió esetén.

A reperfúzió korai szakaszában megfigyelt ADC javulásnak köszönhetően a II. csoportban az 1 órás reperfúziós időszak végén a relatív ADC alapján meghatározott HLV alacsonyabb volt a különböző ADC küszöbértékeken, mint az I. csoportban, ahol nem történt recirkuláció. Ez a grafikonon úgy jelent meg, hogy az I. csoporthoz képest a II. csoportban a relatív ADC küszöbérték-HLV görbe lefelé tolódott. Ugyanakkor, a III. csoportban, vagyis a 10 órás reperfúzió végén, az ADC értékek másodlagos rosszabbodása miatt a különböző relatív ADC küszöbértékeken meghatározott HLV nőtt a II. csoporthoz viszonyítva, vagyis a relatív ADC küszöbérték-HLV görbe felfelé mozdult a II. csoporthoz képest. Az energiametabolizmus károsodását, illetve a szöveti acidózist jelző relatív ADC küszöbértékek csoportonkénti meghatározásához az ATP hiányból és a pH csökkenésből számított féltekei lézió terfogatát a megfelelő relatív ADC küszöbérték-HLV grafikonba illesztettük. Az ATP hiány alapján meghatározott HLV az I. csoportban, ahol nem volt reperfúzió, 26.0±10.6% volt, míg a II. csoportban az 1 órás reperfúzió végén ez az érték 3.3±2.4%, a III. csoportban a 10 órás reperfúzió végén pedig 11.2±4.7% volt. Ezek az adatok, hasonlóan az ADC adatokhoz, a károsodott energiametabolizmus (ATP hiány) alapján meghatározott HLV részleges, de szignifikáns csökkenését jelezték a 1 órás reperfúziót

követően (p<0.001 az I. csoporthoz képest), majd a HLV növekedését mutatták 10 óra recirkuláció elteltével (p<0.05 a II. csoporthoz képest). Az ATP hiányt jelző relatív ADC

küszöbértéket az egyes grafikonokról leolvasva azt találtuk, hogy ez konzekvensen a kontroll érték kb. 77%-a volt a különböző csoportokban és kísérleti időszakokban. Ez azt jelenti, hogy a relatív ADC 77%-os értéke korrelál az energiametabolizmus károsodásával az 1 órás MCAO végén csakúgy, mint az 1 vagy 10 órás reperfúziót követően.

Ahhoz, hogy az ATP hiány és a 77% alatti relatív ADC érték által meghatározott léziók térbeli megoszlását is összehasonlíthassuk, úgynevezett incidencia térképeket alkottunk mindhárom csoportban (**27. ábra**). Ennek során az ATP hiányt mutató és a 77% alatti relatív ADC-vel jellemezhető léziók előfordulási gyakoriságát egy-egy templáton megrajzoltuk. Ezek a térképek az ATP hiány és a 77% alatti relatív ADC alapján meghatározott léziók meglehetősen szoros térbeli hasonlóságát mutatják. Ugyanakkor ezek az incidencia térképek arra is felhívják a figyelmet, hogy (legalábbis patkányokban) mind az 1 órás ischaemia, mind az ezt követő reperfúzió során az energiametabolizmus szempontjából a caudatum-putamen régiójában a kimenetel számottevően rosszabb, mint a cortexben.



27. ábra Az ATP hiány és a 77% alatti relatív ADC érték által meghatározott léziók területi megoszlása a caudatum-putamen szintjében készített koronális síkú incidencia térképeken az egyes csoportokban. Az incidencia térképek az ATP hiány és a 77% alatti relatív ADC alapján meghatározott léziók meglehetősen szoros területi hasonlóságát mutatják a különböző reperfúziós idővel jellemezhető csoportokban. Az ábra jól szemlélteti az ATP és ADC értékek átmeneti javulását a korai reperfúzió időszakában, majd ezen értékek másodlagos károsodását a recirkuláció későbbi fázisában.

A szöveti acidosis alapján meghatározott HLV az I. csoportban, ahol nem volt reperfúzió, 38.1±6.5% volt, míg a II. csoportban az 1 órás reperfúzió végén 4.8±3.5%, a III. csoportban a 10 órás reperfúzió végén pedig 10.9±5.2% volt. Ez a HLV érték az 1 órás permanens ischaemiát jelképező I. csoport minden kísérleti állatában nagyobb volt, mint az ATP hiány alapján mért HLV, azonban a II. és III. csoport állataiban, vagyis 1 és 10 órával a recirkuláció után az ATP hiány és a szöveti acidosis által meghatározott léziók térfogata nem különbözött számotevően. Ez azt eredményezte, hogy rövid időtartamú permanens ischaemia esetén (I. csoport) a szöveti acidosis kialakulásával korreláló relatív ADC küszöbérték lényegesen magasabb volt, mint az ATP hiányt jelző ADC küszöb, míg az 1 és 10 órás reperfúzió után (II. és III. csoport) az energiametabolizmus károsdását és az acidózist jelző relatív ADC értékek hasonlóak voltak.

A fentieken túl a szöveti glükóz koncentrációt is meghatároztuk az ATP hiányt mutató területekben és az így mért értéket összehasonlítottuk az ellenoldali félteke megfelelő területében mért glükóz szinttel. Ezek az adatok az ischaemiás időszak végén alacsonyabb glükóz koncentrációt mutattak az ATP hiánnyal jellemezhető területben ($0.9\pm0.4 \mu$ mol/g), mint az ellenoldali félteke hasonló régiójában ($5.1\pm0.5 \mu$ mol/g). Ezzel szemben a glükóz tartalom az 1 órás reperfúziót követőn (II. csoport) hasonló volt az érintett félteke ATP hiányos területében ($5.0\pm0.8 \mu$ mol/g) és az ellenoldali féltekében ($4.1\pm1.4 \mu$ mol/g), a 10 órás reperfúzió után (III. csoport) pedig magasabbnak bizonyult az ipsilateralis félteke ATP hiányos szövetében, mint az ellenoldalon ($4.7\pm0.6 \mu$ mol/g vs. $3.9\pm0.6 \mu$ mol/g, p<0.05).

4.1.3. Átmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NAD szintre egerekben

A tanulmányban arra kerestünk választ, hogy milyen összefüggés van a NAD szint és az energiametabolizmusban bekövetkező változás között fokális cerebrális ischaemiát követő reperfúzió során. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a reperfúzió során megfigyelhető másodlagos energiametabolizmus károsodás időszakában megelőzi-e a NAD tartalom csökkenése az ATP depléciót, vagyis megállja-e a helyét a PARP hipotézis, miszerint az ATP depléció oka a túlzott PARP aktiváció következtében kialakuló NAD hiány lenne.

A vizsgálat során az egerekben MCA okklúziót követően különböző időtartamú (0, 1, 3, 6, 24 óra) reperfúziót indukáltunk, melynek végén az állatokat lefagyasztottuk. A NAD szint, az energia metabolitok, a teljes adenilát pool és az adenilát energiatöltöttség MCAO és reperfúzió alatti változásait a **28. ábra** foglalja össze. Az ischaemia során az ATP szint a kontroll érték 20%-ára csökkent. Az 1 órás ischaemia végére az AMP szint a kontroll érték 7.5-szeresére növekedett, míg az adenilát energiatöltöttség a kontroll 43%-ára csökkent. A teljes adenilát pool az MCAO során 50%-ra csökkent, mely az adenilátok jelentős degradációjára, lebomlására utalt. Az ATP szint az 1 illetve 3 órával a reperfúzió után a kontroll érték 69%-ára, illetve 78%-ára javult, s ezzel párhuzamosan a teljes adenilát pool is 72%-ra illetve 81%-ra nőtt. A recirkuláció ezen korai fázisában az ADP és AMP szint, valamint az energiatöltöttség az érintett féltekében nem különbözött az ellenoldali, kontrollként szolgáló féltekében mért értékektől, vagyis teljesen normalizálódott. Ebben az

időszakban a NAD szint az ipsilateralis MCA régióban nem különbözött szignifikánsan az ellenoldali MCA régióban mért NAD tartalomtól. Mindez azt jelenti, hogy az ATP későbbi, másodlagos csökkenése hátterében nem a NAD depléció áll, melyet egyébként egy esetleges túlzott PARP stimuláció a NAD felhasználás révén okozhatna.



28. ábra Az energiametabolizmus és a NAD szint változása 1 órás átmeneti fokális ischaemia során egerekben. A kísérleti állatokban a bal oldali MCA-t 1 órára szilikonozott fonál használatával intraluminális technikát alkalmazva elzártuk, majd az egerek különböző csoportjaiban 0, 1, 3, 6, illetve 24 órás reperfúziót indukáltunk. A kísérlet végén az egereket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az analízishez használt szövetmintákat mindkét félteke MCA által ellátott régiójából vettük. A NAD-ot és az energiametabolitokat perklórsavval vontuk ki. Az ATP, ADP és AMP tartalmat HPLC-vel és HPLC-hez kapcsolt ultraibolya detektorral mértük. A NAD szintet spektrofotométerrel határoztuk meg egy enzimatikus láncreakció végén. A teljes adenilát poolt az ([ATP]+[ADP]+[AMP]), az energiatöltöttséget az ([ATP]+0.5[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP]) képlet alapján számoltuk. Az eredményeket az ellenoldali, kontrollként szolgáló féltekében mért értékek %-ában adtuk meg. A kontroll értékek a következők voltak: [ATP]: 30.50±1.85 nmol/g, [ADP]: 3.50±0.41 nmol/g, [AMP]: 1.20±0.37 nmol/g, [NAD]: 6.36±0.56 nmol/mg fehérje. A két félteke között talált statisztikailag szignifikáns eltéréseket az alábbiak szerint jelöltük: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. A statisztikai analízishez ANOVA-t használtunk, majd Fisher PLSD tesztet.

Az ATP szint és a teljes adenilát pool másodlagos csökkenése már 6 órával a reperfúzió után megjelent, s az ATP szint a kontroll 66%-ára, a teljes adenilát poolpedig az ellenoldali félteke értékének 69%-ára csökkent. Ugyanakkor 6 órával a reperfúzió után az ADP, AMP és NAD szintek, valamint az energiatöltöttség az érintett féltekében nem különbözött a kontralaterális kontroll féltekében mért értékektől. A 24 órás reperfúzió után mért adatok azt igazolták, hogy ekkorra az ATP szint, a teljes adenilát pool, s NAD szint a kontroll érték kb. 30%-ára csökkent. Ugyanakkor az AMP szint csak kissé emelkedett és az energiatöltöttség csak közepesen csökkent, mely arra utal, hogy a metabolikus eltérések a reperfúzió ezen szakában különböznek az ischaemia alatt megfigyelt eltérésektől.

Az átmeneti agyi ischaemia okozta esetleges NAD és ATP csökkenés közötti okokozati összefüggés kimutatására leginkább a NAD csökkenés és ATP csökkenés mértékének az összehasonlítása alkalmas. A két érték változása közötti összefüggés a **29. ábrán** látható. Az összehasonlításból kihagytuk azoknak az állatoknak az eredményeit, amelyeknél az 1 órás MCAO után befejeztük a kísérletet, vagyis amelyeknél nem volt reperfúzió. Ennek az az oka, hogy ebben az esetben az ATP hiány hátterében az oxidatív foszforiláció zavara és a teljes adenilát pool degradációja állt. Ha feltételezzük, hogy helyes a PARP hipotézis, mely szerint a PARP stimuláció okozta túlzott NAD felhasználás és következményes NAD hiány miatt nem termelődik ATP, akkor azt várnánk, hogy a NAD depléció mértéke megegyezne, vagy meghaladná az ATP depléció mértékét. Ezzel szemben, két minta kivételével a NAD szint csökkenése kevésbé volt kifejezett, mint az ATP depléció (**29. ábra**).



29. ábra A fokális cerebrális ischaemia és reperfúzió indukálta ATP és NAD szint változások közötti összefüggés. A vizsgálatok során a kísérleti állatokban 1 órás fokális ischaemiát és 1, 3, 6 és 24 órás reperfúziót indukáltunk. A NAD és ATP szint változások meghatározása ugyanazokból az a. cerebri media területéből vett mintákból történt, s az értékeket az ellenoldali kontroll félteke megfelelő régiójából származó mintákban mért értékek százalékában fejeztük ki. Kettő kivételével az összes mintában az ATP depléció mértéke nagyobb volt, mint a NAD csökkenés mértéke. (A szaggatott vonal azoknak a pontoknak a halmazát jelöli, melyek azonos mértékű NAD és ATP szintet jeleznének. Kettő kivételével az összes érték ez alatt a vonal alatt volt, jelezve, hogy az ATP szint alacsonyabb volt, mint a NAD tartalom.)

Az ATP szint reperfúzió után észlelt másodlagos csökkenését vizsgálandó, az ATP szint változás és a teljes adenilát pool változás közötti összefüggést elemeztük (**30. ábra**). Azokat az eredményeket, melyeket közvetlenül az 1 órás ischaemia után kaptunk, itt sem vettük figyelembe. Az ATP szint változás és a teljes adenilát pool változás között lineáris összefüggést találtunk (r=0.99), ami arra utal, hogy a reperfúzió során észlelt másodlagos energiametabolizmus károsodás hátterében a teljes adenilát pool csökkenése és nem az ATP termelés és felhasználás közötti eltérés áll.



30. ábra Az ATP szint változás és a teljes adenilát pool változás közötti összefüggés tranziens fokális cerebrális ischaemia reperfúziós szakában. A vizsgálatok során az egerekben 1 órás fokális ischaemiát és 1, 3, 6 és 24 órás reperfúziót indukáltunk. Az ATP szint és a teljes adenilát szint változásainak a meghatározása ugyanazokból az a. cerebri media területéből vett mintákból történt, s az értékeket az ellenoldali kontroll félteke megfelelő régiójából származó mintákban mért értékek százalékában fejeztük ki. Az ATP szint csökkenése szoros korrelációt mutatott a teljes adenilát tartalom változásával, jelezve, hogy a 3 óránál hosszabb reperfúzió során észlelt másodlagos energiametabolizmus károsodás hátterében a teljes adenilát pool csökkenése és nem az ATP termelés és felhasználás közötti eltérés áll.

4.2. HUMÁN TANULMÁNYAINK EREDMÉNYEI

4.2.1. Az akut alkoholfogyasztás hatása az agyi hemodinamikai változásokra egészséges személyekben ortosztatikus stressz során

Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy az akut alkoholbevitel hogyan befolyásolja az ortosztatikus stressz hatására a hemodinamikai paraméterekben (vérnyomás, szívfrekvencia, agyi véráramlási sebesség az MCA-ban, cerebrovaszkuláris rezisztencia) bekövetkező változásokat egészséges személyekben.

Az alkoholfogyasztás $0,91 \pm 0,11\%$ alkoholkoncentrációt eredményezett az alkoholos ital elfogyasztása után 70 perccel. Nem találtunk szignifikáns eltérést a fekvő helyzetben mért hemodinamikai paraméterek (szívfrekvencia /HR/, szisztolés vérnyomás /sBP/, diasztolés vérnyomás /dBP/, arteriás középvérnyomás /mBP/, a bal és jobb MCA-ban mért átlagsebesség) alkoholfogyasztás előtti és utáni értékeiben.

A HUT teszt hatása a hemodinamikai paraméterekre alkoholfogyasztás előtt és után

Az ortosztatikus stressz szignifikáns növekedést eredményezett a szívfrekvenciában, a szisztolés, diasztolés vérnyomásban és az artériás középvérnyomásban alkoholfogyasztás előtt és után egyaránt, miközben az agyi véráramlási átlagsebesség szignifikánsan csökkent mindkét MCA-ban (**31.a ábra**).

A HUT teszt által indukált relatív változások elemzése (**31.b ábra**) azt igazolta, hogy a szívfrekvencia növekedése szignifikánsan nagyobb volt az alkohol hatása alatt, mint az alkoholfogyasztás előtt. Alkoholfogyasztást követően a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek növekedése a HUT fázisban kevésbé volt kifejezett (p=0.05), míg az artériás középvérnyomás emelkedése szignifikánsan kisebb volt, mint az alkoholbevitel előtti kontroll periódusban. Mind alkoholfogyasztás előtt, mind azt követően, a függőleges helyzetben tapasztalt szisztémás artériás középvérnyomás (mBP) növekedése ellenére az MCA áramlási sebességértékek (MFVMCA) szignifikánsan csökkentek mindkét MCA-ban a fekvő állapothoz képest, de az MFVMCA-nak ez a csökkenése szignifikánsan nagyobb mértékű volt mindkét MCA-ban alkoholfogyasztás után, mint az előtt (**31.b ábra**).



31. ábra. Hemodinamikai paraméterek a kísérlet különböző fázisaiban. Az a) ábrarészben a szívfrekvencia (HR), a szisztolés (sBP), a diasztolés (dBP) és az artériás középvérnyomás

(mBP) abszolút értékeit, valamint a bal és a jobb MCA-ban mért átlagos áramlási sebességértékeket (FVL és FVR) tüntettük fel hanyatt fekvő pozícióban (S) és a HUT fázisban (HUT), alkoholbevitel előtt (Kontroll) és után (Alkohol; + A). Megfigyelhető, hogy a szívfrekvencia és a vérnyomás szignifikánsan növekedett, míg az MCA-ban mért áramlási sebesség szignifikánsan csökkent a HUT fázisban a hanyatt fekvő pozícióban mért alapértékekhez viszonyítva mind alkoholfogyasztás előtt mind utána. A b) ábrarészben a HUT teszt által indukált relatív változások láthatók a hanyatt fekvő pozícióban mért értékek százalékában (%) kifejezve. A HUT teszt által indukált relatív változások elemzése a szívfrekvencia szignifikánsan nagyobb mértékű emelkedését, az artériás középvérnyomás kevésbé jelentős növekedését és az MCA-ban mért átlagos áramlási sebességértékek szignifikánsan nagyobb mértékű csökkenését igazolta alkohol hatása alatt, mint azt megelőzően a kontroll periódusban. Az ábrázolt értékek: minimum, maximum, median, interquartilis értékek.

A vérnyomás a szív és az a. cerebri media szintjében

Bár a szív szintjében mért artériás középvérnyomás az ortosztatikus stressz során mind a kontroll szakaszban, mind az alkoholfogyasztás után növekedett, az a. cerebri media szintjében becsült vérnyomásértékek (mBPMCA) korrekcióra szorulnak. Ennek az az oka, hogy a HUT fázisban a közel függőleges helyzetben álló személyekben a szív és az agy közötti vertikális távolság számottevő, és így az MCA szintjében a vérnyomás a csökkent hidrosztatikai nyomás miatt alacsonyabb, mint a szív magasságában. Ezt figyelembe véve, bár a szív magasságában mért szisztémás artériás középvérnyomás (mBP) a HUT pozícióban szignifikánsan nőtt, az MCA szintjére korrigált vérnyomásértékek (mBPMCA) mégis szignifikánsan alacsonyabbak voltak a vertikális pozícióban, mint a vízszintes helyzetben (7. táblázat). Az alkoholfogyasztás előtti kontroll időszakhoz képest az alkoholbevitelt követően a felállítás hatására jelentkező relatív mBP növekedés kisebb (11% vs. 15%; p <0,05), míg a relatív mBPMCA csökkenés kifejezettebb (-17% vs. -14%; p <0,05) volt (**7. táblázat**).

Alkoholfogyasztás előtt	Fekvő helyzet	HUT	HUT teszt által indukált változás
mBP (Hgmm)	85 (72;102)	97 (83;115)	15% (6%;23%)
mBPMCA (Hgmm)	85 (72;102)	73 (60;92)	-14% (-23%;-6%)
Alkoholfogyasztás után	Fekvő helyzet	HUT	HUT teszt által indukált változás
Alkoholfogyasztás után mBP (Hgmm)	Fekvő helyzet 87 (73;103)	HUT 98 (81;115)	HUT teszt által indukált változás 11% (2%;28%) ^a

7. táblázat Artériás középvérnyomás (mBP) és az MCA-k szintjére korrigált artériás középvérnyomás (mBPMCA) fekvő helyzetben és HUT pozícióban alkoholfogyasztás előtt és után

^a A HUT teszt szignifikánsan kisebb relatív növekedést indukált az mBP-ben (p<0,05) és szignifikánsan nagyobb relatív csökkenést az mBP_{MCA} -ban (p<0,05) alkoholbevitelt követően, összehasonlítva a megfelelő relatív változásokkal a kontroll periódusban, alkoholfogyasztás előtt. Az értékek: median (min;max).

Az mBPMCA és MFVMCA értékek HUT teszt által kiváltott relatív változásainak összehasonlítása az alkoholbevitel előtti kontroll és az alkoholfogyasztás utáni teszt periódusban

A kontroll periódusban, az mBPMCA és MFVMCA értékek HUT teszt által kiváltott relatív változásainak összehasonlítása (**32. ábra**) azt igazolta, hogy az MFVMCA relatív csökkenése (-8 és -9 Hgmm a bal és jobb MCA-ban) szignifikánsan kisebb volt, mint az mBPMCA csökkenése (-14%). Ezzel ellentétben, alkoholfogyasztás után az MFVMCA relatív csökkenése (-15 cm/s mindkét MCA-ban) és az mBPMCA relatív csökkenése (-17%) hasonló volt.



32. ábra. Az MCA-k szintjére korrigált artériás középvérnyomás (mBP_{MCA}) és a bal és a jobb oldali MCA-ban mért átlagos áramlási sebességértékek (MFV-L és MFV-R) HUT teszt által kiváltott relatív változásainak összehasonlítása a kontroll és az alkoholfogyasztást követő periódusban. A kontroll periódusban az MFV relatív csökkenése (Δ MFV-L és Δ MFV-R) szignifikánsan kisebb volt, mint az mBPMCA csökkenése (Δ mBPMCA), ami működő autoregulatióra utal. Ezzel ellentétben, alkoholfogyasztás után az MFV (Δ MFV-L + A és Δ MFV-R + A) és az mBPMCA (Δ mBPMCA + A) relatív csökkenése nem különbözött szignifikánsan. Ez azt jelzi, hogy a cerebralis autoreguláció alkohol hatása alatt nem volt elég hatékony ahhoz, hogy kompenzálja az mBPMCA csökkenését, ami az MFV hasonló mértékű csökkenéséhez vezetett. Az ábrázolt értékek: minimum, maximum, median, interquartilis értékek. (+ A: alkoholfogyasztás utáni periódust jelzi.)

Az alkohol hatása a cerebrovaszkuláris rezisztencia index HUT teszt által okozott változására

A cerebrovaszkuláris rezisztencia index (CVRi) meghatározása céljából az MCA inszonáció szintjére korrigált artériás középvérnyomás értéket (mBPMCA) elosztottuk az MCA-ban mért átlagos áramlási sebességértékkel (MFVMCA), vagyis CVRi = mBPMCA / MFVMCA. Míg a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index az alkoholfogyasztás előtti kontroll szakaszban csökkent a felállítást követően (**33. ábra**), addig hasonló változás nem volt kimutatható alkoholbevitel után. Pont ellenkezőleg, az alkohol hatása alatt a cerebrovaszkuláris rezisztencia index szignifikánsan nőtt a HUT fázisban a fekvő helyzethez képest.



33. ábra. A számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index (CVRi) hanyatt fekvő helyzetben (S) és a HUT fázisban (HUT), alkoholfogyasztás előtt (Kontroll) és után (Alkohol; + A). Alkoholfogyasztás előtt a cerebrovaszkuláris rezisztencia index csökkent függőleges helyzetben a vízszintes állapothoz képest, ami a rezisztenciaerek dilatációjára utal. Ezzel ellentétben, alkohol hatása alatt a cerebrovaszkuláris rezisztencia index növekedett a HUT fázisban, ami károsodott cerebralis vazodilatációt jelez. Az ábrázolt értékek: minimum, maximum, median, interquartilis értékek.

4.2.2. A dohányzás és a dohányzás elhagyásának hatása a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási válaszra

Elsőként a dohányosokban és nem dohányzókban mért adatokat ismertetem. Az átlagéletkor a dohányosokban 31±5 év, a nem dohányzókban 31±6 év volt (**8. táblázat**). A két csoport között a vérnyomásban és a laboratóriumi értékekben, beleértve a Westergreen értéket és a C-reaktív protein értéket is, szignifikáns eltérés nem volt. A dohányosok és nem dohányzók IMT értéke között sem találtunk szignifikáns különbséget.

A vizuális stimuláció indukálta relatív csúcs-szisztolés áramlási sebességváltozást dohányosokban és nem dohányosokban a **34. ábra** mutatja. Az ismételt méréses varianciaanalízis szignifikáns különbséget igazolt a két csoport között (p<0.001). Mind a maximális sebességváltozás mértéke (Vmax), mind a stimulációs fázis 2. felében, a stabilizáció után mért relatív áramlási sebességértékek (Vplateau) lényegesen magasabbak voltak a nem dohányzók csoportjában, mint a dohányosokban (**8. táblázat**). A férfiak és a nők eredményei között egyik csoporton belül sem találtunk szignifikáns eltérést.

Vizsgált jellemző	Dohányosok	Nem dohányzók	p érték
	(n=16)	(n=16)	
Kor (év)	31.1±4.7	30.6±5.6	0.8377
Westergreen érték (mm/h)	9±6	7±5	0.3716
C-reaktív protein (mg/L)	1.47±1.25	1.51 ± 2.20	0.9577
Hematokrit	0.435 ± 0.039	0.428 ± 0.042	0.6906
Hemoglobin (g/L)	143.4±13.1	141.2±15.2	0.7013
Fehérvérsejtszám (G/L)	6.6±1.5	6.8±2.2	0.833
Trombocitaszám (G/L)	243±50	261±53	0.3918
Protrombin idő (s)	9.9±0.8	9.8±0.4	0.5783
APTT (s)	36.4±4.0	36.2±2.9	0.9269
Trombin idő (s)	16.5 ± 1.8	16.5±1.2	0.9900
Fibrinogén (g/L)	3.1±0.6	2.9±0.9	0.5338
Nátrium (mmol/L)	142.3±2.8	142.8±3.6	0.7110
Kálium (mmol/L)	4.3±0.2	4.2 ± 0.4	0.5987
Glükóz (mmol/L)	4.6±0.8	4.5±0.3	0.6208
Urea (mmol/L)	4.9±1.1	4.8±1.2	0.8170
Kreatinin (umol/L)	70.9±16.3	67.4±16.2	0.6144
Triglicerid (mmol/L)	1.19±0.73	0.90 ± 0.53	0.3374
Koleszterin (mmol/L)	4.43±0.94	4.26±0.80	0.6761
LDL-koleszterin (mmol/L)	2.49±0.91	2.36 ± 0.75	0.7414
HDL-koleszterin (mmol/L)	1.51±0.52	1.55±0.33	0.8196
Intima-media vastagság (mm)	$0,420\pm0,045$	0,392±0,049	0.1794
v _{max} (%)	19±4	30±3	0.0001
v _{plateau} (%)	14±5	21±3	0.0005

8. táblázat A dohányzók és nem dohányzók adatai (*p<0,001; ANOVA)

APTT: aktivált parciális tromboplasztin idő



34. ábra A vizuális stimuláció kiváltotta relatív csúcs-szisztolés áramlási sebesség változása dohányosokban és nem dohányzókban. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik.

A dohányzás elhagyásának hatását vizsgáló tanulmányba bevont önkéntesek adatait a 9. táblázat mutatja. A nem dohányzók, a permanens dohányosok és a korábbi dohányosok között sem az életkorban, sem a vérnyomásban vagy a szívfrekvenciában nem volt szignifikáns különbség. A naponta elszívott cigaretták száma és a dohányzás időtartama a dohányosokban és a dohányzás elhagyása előtt a korábbi dohányosokban hasonló volt. A laboratóriumi értékekben, beleértve a gyulladásos markereket is (C-reaktív protein, Westergreen érték), ebben a vizsgálatban sem volt lényeges különbség a csoportok között és az IMT érték és a P100 hullám amplitudója és latenciája is hasonló volt a 3 csoportban.

Viszgált naraméter	Dohányosok	Korábbi dobányosok	Nem dohányzók
viszgan parameter	(n=15)	(n=15)	(n=15)
	(II-IS)		(1-10)
Westergreen ertek (mm/h)	9±6	8±5	6±3
C-reactív protein (mg/L)	1.91 ± 1.55	2.11±1.85	1.42 ± 2.11
Hematokrit	0.438 ± 0.037	0.438 ± 0.066	0.428 ± 0.040
Hemoglobin (g/L)	144.7±12.3	143.0±15.3	140.7 ± 14.6
Fehérvérsejtszám (G/L)	6.9±1.7	6.6±1.4	6.7±2.1
Trombocitaszám (G/L)	244±48	253±42	255±48
Protrombin idő (s)	9.8±0.8	9.7±0.7	9.7±0.5
APTT (s)	35.8±3.0	35.9±2.6	36.0±2.8
Trombin idő (s)	16.7±1.6	16.2±1.2	16.2±1.2
Fibrinogén (g/L)	3.2±0.6	3.0±0.8	2.8 ± 0.8
Nátrium (mmol/L)	142.6±2.7	143.5±2.7	142.7±3.5
Kálium (mmol/L)	4.4 ± 0.4	4.5±0.5	4.3±0.5
Glükóz (mmol/L)	4.7±0.7	4.8 ± 0.8	4.7±0.5
Urea (mmol/L)	5.0±1.1	$5.0{\pm}0.8$	4.9±1.2
Kreatinin (umol/L)	71.7±15.1	72.2±19.3	69.2±16.7
Triglicerid (mmol/L)	1.20±0.69	1.10 ± 0.49	0.94 ± 0.52
Koleszterin (mmol/L)	4.50±0.92	4.62 ± 0.70	4.25±0.76
LDL-koleszterin (mmol/L)	2.62 ± 0.84	2.57±0.79	2.39±0.72
HDL-koleszterin (mmol/L)	$1.44{\pm}0.48$	1.52±0.39	1.54 ± 0.32

9. táblá:	at A dohán	yzók, a	korábbi	dohány	osok és a	nem dohán	yzók labo	oratóriumi	értékei
-----------	------------	---------	---------	--------	-----------	-----------	-----------	------------	---------

APTT: aktivált parciális tromboplasztin idő

A vizuális stimuláció kiváltotta abszolút és relatív csúcs-szisztolés áramlási sebességek időbeli változását a **35. ábra** mutatja. A 3 csoportban a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért kiindulási abszolút áramlási sebességek között nem volt szignifikáns eltérés (**35.A ábra, 10. táblázat**).

A relatív áramlási sebességek változását a stimulációs fázisban (**35.B ábra**) ismételtméréses variancia-analízissel hasonlítottuk össze, mely szignifikáns csoport-főhatást igazolt (p<0.01). Ez arra utal, hogy a relatív áramlási sebességértékek szignifikánsan különböztek a 3 csoport között. Amikor a korábbi dohányosok sebességértékeit hasonlítottuk össze a nem dohányzókban mért adatokkal, a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási sebességváltozás szignifikánsan alacsonyabb volt a korábbi dohányosokban mint a nem dohányzókban (p<0.002). Ezzel szemben nem tudtunk szignifikáns csoport-főhatást kimutatni a korábbi és a permanens dohányosok között (p=0.0556), noha a különbség közel volt a szignifikanciát jelző határértékhez.





A maximális relatív sebességváltozás (Vmax) a korábbi dohányosokban kisebb volt, mint a nem dohányzókban (p=0.0037), de nagyobb mint a permanens dohányosokban (p=0.0132; **10. táblázat**). A stimulációs fázisban a véráramlási sebesség stabilizációja után mért érték (Vplateau) szignifikánsan kisebb volt a korábbi dohányosokban a nem dohányzókhoz képest (p = 0.0154), de nem volt szignifikáns eltérés a permanens és korábbi dohányosok között (p=0.1553).

A légzésvisszatartási teszt értékei a **10. táblázatban** és **36. ábrán** láthatók. A légzésvisszatartás során mért vazoreaktivitás jobb volt a nem dohányosokban a korábbi (p<0.05) és a permanens dohányosokhoz képest (p<0.01), de nem találtunk szignifikáns eltérést a korábbi és a permanens dohányosok között.

Vizsgált jellemző	Dohányosok	Korábbi dohányosok	Nem dohányzók
	(n=15)	(n=15)	(n=15)
Kor (év)	29.6±5.2	27.5±4.9	29.4±5.5
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	118±8	119±9	117±9
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	76±6	77±5	76±5
Szívfrekvencia (1/min)	71±5	73±6	74±5
Elszívott cigaretták száma (db/nap)	19±5	20±6 (a leszokás előtt)	NA
Dohányzás időtartama (év)	5±1	5±2 (a leszokás előtt))	NA
Leszokás ideje a vizsgálat előtt (hó)	NA	12±4	NA
Intima-media vastagság (mm)	0.427 ± 0.039	0.423 ± 0.041	0.399 ± 0.043
P100 hullám latencia (ms)	103.4 ± 1.78	103.6 ± 1.71	103.2±1.93
P100 hullám amplitudó (µV)	6.77±2.30	6.55±1.88	6.59±2.14
Kiindulási áramlási sebesség (cm/s)	53±10	52±7	52±7
vmax (%)	19±4*	24±5	30±4†
vplateau (%)	13±5 (NS)	16±4	21±4*
BHI (%/s)	1.3±0.4 (NS)	1.4±0.2	$1.7{\pm}0.3^{\#}$

10. táblázat. A dohányosok, korábbi dohányosok, és nem dohányzók élettani paraméterei, dohányzási szokásai és a műszeres vizsgálatok eredményei

NA: nem értékelhető; NS: nem szignifikáns; BHI (breath-holding index: légzésvisszatartási teszt). *:p<0.02 a korábbi dohányosokhoz képest; †p<0.005 a korábbi dohányosokhoz képest; *p<0.05 a korábbi dohányosokhoz képest;



36. ábra A légzésvisszatartás során mért vazoreaktivitási index (breathholding index:BHI) a dohányosokban, korábbi dohányosokban és a nem dohányzókban. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik.

4.2.3. Az acetazolamid kiváltotta vazodilatáció hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a vizuális stimuláció okoz-e további cerebrális vazodilatációt és ezzel áramlási sebességnövekedést a PCA-ban akkor is, amikor előzetesen intravénás acetazolamid adással már a rezisztenciaerekben szignifikáns dilatációt idéztünk elő.

A vizsgálatban résztvevők átlagéletkora 33±6 év volt. A rutin laboratóriumi vizsgálat során mért értékek a referencia tartományon belül voltak. A vizsgálat elején a vizuális stimuláció (olvasás) hatására kialakuló áramlási választ vizsgáltuk a PCA-ban (VEF1), majd a vizsgált személyek 15 mg/kg acetazolamidot kaptak intravénásan. Az acetazolamid hatás maximumán ismét funkcionális transzkraniális Doppler vizsgálat történt, vagyis újra meghatároztuk az olvasás indukálta áramlási választ a PCA-ban (VEF2). Sem az acetazolamid adás előtt és után, sem a funkcionális TCD tesztek előtt és után nem volt szignifikáns eltérés a vérnyomás és a szívfrekvencia értékekben (**11. táblázat**).

Vizsgált paraméter	VEF1 előtt Kiindulási érték	VEF1 után AZ előtt	VEF2 előtt AZ után	VEF2 végén
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	121±6	122±7	123±6	122±6
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	78±4	79±4	77±4	77±5
Szívfrekvencia (1/min)	74±7	73±6	74±7	75±7

AZ: acetazolamid; VEF1 (visually-evoked flow test): az első vizuális stimuláció kiváltotta áramlási válasz vizsgálata, az acetazolamid adás előtt;VEF2: (visually-evoked flow test) a második vizuális stimuláció kiváltotta áramlási válasz vizsgálata, az acetazolamid beadása után 10 perccel. A páros t-próba nem igazolt szignifikáns különbséget a kísérlet különböző fázisaiban mért vérnyomás és szívfrekvencia értékeiben

Az acetazolamid hatása a PCA-ban mért csúcs-szisztolés áramlási sebességre

Az AZ hatás értékeléséhez az acetazolamid adás előtt és után, a szemcsukás időszakában mért csúcs-szisztolés áramlási sebességértékeket használtuk. Az AZ 15 mg/kg adagban történő intravénás adása után a csúcs-szisztolés áramlási sebesség már a 2. percben emelkedett és a megfigyelési időszakban végig szignifikánsan magasabb maradt a kiindulási értékhez képest (**37. ábra**). Az áramlási sebesség az első 10 percben elérte a maximumát és az azt követő 10 percben, amikor a második vizuális stimuláció indukálta áramlási tesztet végeztük, nem változott érdemben. Az alkalmazott 15 mg/kg AZ dózis 36±9% maximális áramlási sebességnövekedést eredményezett a kiindulási sebességértékhez képest.



37. ábra Az acetazolamid (AZ) hatása az artéria cerebri posteriorban (PCA) mérhető abszolút (cm/s) és relatív (a kiindulási érték %-a) csúcs-szisztolés áramlási sebességer. Az áramlási sebességértékeket minden percben a szemcsukási fázis utolsó 5 másodpercében mért adatok átlagából számoltuk. Az alapsebesség értékeit a TCD szondák rögzítését követően határoztuk meg, még az első funkcionális TCD teszt előtt, s a későbbi relatív sebességértékeket ezen alapérték százalékában fejeztük ki. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik. A "vizuális stimuláció indukálta áramlási teszt 1" az acetazolamid adást megelőző, a "vizuális stimuláció indukálta áramlási teszt 2" az acetazolamid adást követő kísérleti fázist jelzi.

A vizuális stimuláció indukálta áramlási teszt az acetazolamid adás előtt és után

A vizuális stimulus hatására kialakuló abszolút áramlási sebesség növekedése hasonló volt az AZ adás előtt és után (**38. ábra**). Az áramlási sebesség mindkét esetben már a vizuális stimuláció 2. másodpercétől szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő nyugalmi érték (BLelőtt, BLután). Az AZ hatásnak köszönhetően az abszolút áramlási sebesség magasabb volt az AZ adás után, ezért az ismételt-méréses variancia-analízis alkalmazásakor a csoportfőhatás (függetlenül a vizuális stimuláció kiváltotta változásoktól) az AZ adás előtti és utáni stimulációs fázisok között szignifikáns eltérést igazolt (p<0.01). Az AZ adás előtt az abszolút áramlási sebesség a stimulációs fázis idején kissé hamarabb (4 s) elérte a maximumát, mint az



AZ hatás alatt, ennek köszönhetően a csoportonkénti időbeli változás is szignifikánsan különbözött (p < 0.01).

38. ábra Az abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebesség időbeli változása a vizuális stimuláció indukálta áramlási teszt során acetazolamid (AZ) adás előtt és után. Jól látható, hogy az AZ hatásnak köszönhetően a csúcs-szisztolés áramlási sebességek magasabbak voltak az AZ adás utáni teszt során, mint az AZ adás előtt. A csúcs-szisztolés áramlási sebesség a vizuális stimuláció fázisában szignifikánsan emelkedett mind az AZ adás előtt, mind azt követően. A nyilak azt az időpontot jelölik, amikor a sebességértékek elérték maximumukat, mely az AZ adás előtt 11 s-mal, az AZ adás után pedig 15 s-mal a stimuláció kezdete után következett be. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik. /Az alapértékeket a szemcsukási fázis utolsó 5 másodpercében mért adatok átlagából számoltuk az AZ adás előtt (BLelőtt) és után (BLután) is/.

Hogy a vizuális stimuláció indukálta áramlási sebességváltozásokat az AZ adás előtt és után összehasonlíthassuk, relatív áramlási sebességeket számoltunk, melyeket a megfelelő nyugalmi alapértékek (BLelőtt, illetve BLután) százalékában fejeztünk ki (**39. ábra**). Az AZ előtti és utáni vizuális stimuláció indukálta relatív sebességértékek időbeli változásának az összehasonlításakor az ismételt méréses varaincia-analízis nem igazolt szignifikáns csoportfőhatást (p = 0.43), mely azt jeneti, hogy a relatív áramlási sebességértékek változásának a mértéke nem különbözött a két különböző teszt idején. Ugyanakkor a csoportonkénti időbeli változás már szignifikánsan eltért az AZ adás előtt és után (p<0.01), mely arra utalt, hogy az időbeli változás mintája (vagyis a változást jelző görbe alakja) a két fázisban (AZ előtt és után) különbözött. A **39. ábrán** jól látható, hogy a relatív áramlási sebesség meredekebben nőtt az AZ provokáció előtt, mint az AZ adás után, bár a sebességérték mindkét esetben a stimulációs fázis első felében elérte maximumát. A maximális relatív sebességnövekedés az AZ adás előtt 23±4%, míg az AZ adás után 19±4% volt. Az első 15 másodpercben megfigyelt különbség a stimulációs fázis fennmaradó részében már nem volt kimutatható, innentől kezdve az AZ provokáció előtti és utáni görbe lefutása nem különbözött.



39. ábra A relatív csúcs-szisztolés áramlási sebesség időbeli változása az acetazolamid (AZ) adás előtt és után. A relatív áramlási sebességértékeket a megfelelő nyugalmi alapértékek százalékában fejeztük ki. Az ismételt-méréses variancia-analízis nem igazolt szignifikáns csoport-főhatást az AZ adás előtti és utáni vizuális stimuláció indukálta áramlási sebességváltozások között. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik.

A vizuális stimuláció indukálta pulzatilitási index (PI) változások acetazolamid adás előtt és azt követően

Az AZ vazodilatátor hatásának köszönhetően a PI alacsonyabb volt az AZ provokáció után, mint azt megelőzően (**40. ábra**).



40. ábra A vizuális stimuláció hatására létrejövő pulzatilitási index (PI) változása acetazolamid (AZ) adás előtt és után. Jól látható, hogy az AZ vazodilatátor hatása miatt az AZ adás utáni fázisban a PI alacsonyabb volt, mint az AZ adás előtt. A vizuális stimuláció a PI szignifikáns csökkenését eredményezte nemcsak az AZ adás előtti fázisban, hanem az AZ adás után is, azt jelezve, hogy a neuronális aktiváció további vazodilatációt eredményezett a maximális AZ hatás időszakában is. A hibavonalak a szórást (SD) jelzik.

Nemcsak az AZ alkalmazása előtt, hanem azt követően is csökkent a PI a stimulációs fázisban, mely csökkenés hasonlóan az áramlási sebességváltozáshoz, a stimulációs fázis 2. másodpercétől eredményezett szignifikánsan alacsonyabb PI-t a nyugalmi értékhez képest. A PI az AZ provokáció előtt a vizuális stimuláció során 1.08±0.19-ről (nyugalmi érték) 0.92±0.09-ra (a legalacsonyabb érték), míg az AZ adás után 0.93±0.12-ről (nyugalmi érték) 0.81±0.07-ra (legalacsonyabb érték) csökkent. Az AZ adás után a PCA-ban mért relatív PI csökkenés mértéke az AZ adás után (13%±4%) nem különbözött szignifikánsan az AZ adás előtti értékhez (15%±7%) képest (p=0.61). Ezek az adatok azt jelzik, hogy a vizuális stimuláció a PCA ellátási területében a cerebrovaszkuláris rezisztencia csökkenését okozta nemcsak a kontroll, AZ adás előtti fázisban, de a 15 mg/kg adagban adott AZ maximális hatása alatt is.

4.2.4. A hiperventiláció kiváltotta hipokapnia és NSAID készítmények hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

A kísérletben azt vizsgáltuk, hogy vazokonstrikciót okozó faktorok (hipokapnia, NSAID készítmények) gátolják-e a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges cerebrális vazodilatációt.

A hipokapnia indukálta vazokonstrikció neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatása

A hipokapnia indukálta vazokonstrikció neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatásának a vizsgálatához 14 önkéntes, egészséges egyént vontunk be (7 nő és 7 férfi; átlagéletkor: 25±4 év).

A hiperventiláció alatt a vérnyomás értékek nem változtak, azonban a szívfrekvencia szignifikánsan nőtt a normoventilációs fázishoz képest (p<0.001). A kilégzésvégi CO₂ szint és a kapilláris pCO₂ érték szignifikánsan csökkent (p<0.001), míg a vér pH-ja és a kapilláris pO₂ érték pedig növekedett (p<0.001) a HV hatására (**12. táblázat**).

Vizsgált paraméter	Normoventiláció (kontrolll fázis)	Hiperventiláció	р
Légzési frekvencia (1/perc)	16±2	37±3	< 0.001
Kilégzés-végi pCO ₂ (Hgmm)	37±3	25±3	< 0.001
Szívfrekvencia (1/perc)	83±9	98 ± 8	< 0.001
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	113±10	114 ± 12	0.81
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	74±9	74±11	0.90
Nyugalmi áramlási sebesség (cm/s)	58±11	48±11	< 0.01
Nyugalmi pulzatilitási index	$1.02{\pm}0.11$	1.45 ± 0.28	< 0.01
Kapilláris vér pH	7.43 ± 0.02	7.58 ± 0.05	< 0.001
Kapilláris vér pO ₂ (Hgmm)	68±2	83±3	< 0.001
Kapilláris vér pCO ₂ (Hgmm)	35±1	23±2	< 0.001
P100 hullám amplitudó (μV)	7.58 ± 2.08	6.78 ± 1.60	0.39
P100 hullám latencia (ms)	105±4.53	108.2 ± 2.96	0.51

12. táblázat A normoventiláció és hiperventiláció során mért paraméterek.

A VEP paraméterek (P100 hullám amplitúdó és latencia) értékeiben nem volt szignifikáns különbség a normoventilációs és hiperventilációs fázisok között (**12. táblázat**).

A vizuális stimuláció indukálta áramlási teszt a normoventiláció és a hiperventiláció időszakában

A hiperventiláció és következményes hipokapnia okozta vazokonstrikció eredményeként a szemcsukás során mért nyugalmi abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebesség szignifikánsan csökkent (p<0.01), míg a pulzatilitási index értéke szignifikánsan nőtt (p<0.01) a normoventilációs értékekhez képest (**12. táblázat, 41. ábra**).

A vizuális stimuláció (olvasás) kiváltotta, arteria cerebri posteriorokban mérhető abszolút csúcs-szisztolés sebességnövekedés mind a normo-, mind a hiperventilációs fázisban megfigyelhető volt (**41. ábra**). A vizuális stimuláció során mért csúcs-szisztolés áramlási sebességek tekintetében az ismételt méréses variancia-analízis (ANOVA) a kontroll és hiperventilációs fázisok között szignifikáns különbséget igazolt (csoport-főhatás: p<0.001). Emellett a csoportonkénti időbeli változás, vagyis a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási sebességváltozások időbeli lefolyása (a grafikon alakja) is szignifikánsan eltért (p<0.01) a normoventilációs és a hiperventilációs fázisban.



41. ábra. A hipokapnia kiváltotta vazokonstrikció következtében a nyugalmi fázisban (szemcsukás utolsó 5 másodpercében; vastag vonal jelzi az x tengelyen) mérhető abszolút csúcs-szisztolés sebesség szignifikánsan alacsonyabb volt a hiperventiláció (HV) idején a normoventiláció (kontroll) során mért értékhez képest. A vizuális stimuláció (olvasás) hatására a csúcs-szisztolés sebesség mind a normo-, mind a hiperventilációs fázis során nőtt, de a sebességnövekedés mértéke kisebb volt a HV fázis alatt, mint a normoventiláció során.

Hogy a normo- és hiperventilációs fázisokat összehasonlíthassuk, az abszolút sebesség mellett meghatároztuk a relatív sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális áramlási sebességet mind a normo-, mind a hiperventiláció idején a szemcsukás utolsó 5 másodpercében mért nyugalmi áramlási sebességhez viszonyítottuk, és annak százalékában fejeztük ki (**42. ábra**).



42. ábra. A relatív csúcs-szisztolés véráramlási sebesség a normoventilációs (kontroll) és hiperventilációs (HV) fázisok alatt. A vizuális stimuláció (olvasás) kiváltotta relatív áramlási sebességnövekedés szignifikánsan kisebb volt a HV fázis alatt a kontrollhoz képest, mely azt jelzi, hogy a HV kiváltotta hipokapnia a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását szignifikánsan gátolta.

Ismételt méréses variancia-analízissel az abszolút sebességértékekhez hasonlóan a stimulációs fázisban mért relatív áramlási sebességértékekben is szignifikáns különbséget észleltünk a normo- és hiperventilációs fázisok között (csoport-főhatás: p<0.001), s a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási sebességváltozások dinamikája is szignifikánsan eltért a kontroll (normoventiláció) és a hiperventilációs fázisban (csoportonkénti időbeli változás: p<0.001) (**42. ábra**).

A 40 másodperces vizuális stimulációs fázis során mért maximális relatív véráramlási sebességnövekedés szignifikánsan alacsonyabb volt a hiperventiláció során (12±5%) a normoventilációs fázishoz képest (26±7%; p <0.001).

A nem-steroid gyulladásgátlók (indometacin és naproxen) neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatása

A tanulmányban gyógyszermentes (kontroll) időszakban, valamint indometacin, majd naproxen hatás alatt vizsgáltuk a neurovaszkuláris kapcsolatot ugyanazokban az önkéntesekben.

Az NSAID készítmények hatása a hemodinamikai és a VEP paraméterekre

A nem-steroid gyulladásgátlók hatásának vizsgálatához összesen 15 önkéntest vontunk be (8 férfi; 7 nő; átlagéletkor: 25±4 év). Az alap laboratóriumi értékekben nem találtunk szignifikáns különbséget. A szisztolés és diasztolés vérnyomás, valamint a pulzus értékek a kontroll, indometacin és naproxen fázisok alatt nem különböztek szignifikánsan (**13**. táblázat). A VEP paraméterek (P100 hullám amplitudó és latencia) értékeiben szintén nem volt szignifikáns eltérés a kontroll, indometacin és naproxen fázisok között (**13. táblázat**).

Vizsgált paraméter	Kontroll	Indomethacin	Naproxen
	fázis	fázis	fázis
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	116±7	118±6	117±7
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	77±6	78±5	77±5
Szívfrekvencia (1/perc)	74±4	76±5	75±5
Nyugalmi áramlási sebesség (cm/s)	58±10	49±6 **	51±7 **
Nyugalmi pulzatilitási index	0.98 ± 0.07	1.15±0.04 **	1.14±0.05 **
P100 hullám amplitúdó (µV)	7.48±1.63	7.41±1.45	7.36±1.46
P100 hullám latencia (ms)	103.9±2.4	104.1±3.5	104.2±2.9

13. táblázat Kontroll, indometacin és naproxen fázisok alatt mért paraméterek.

** p< 0.01 a kontroll fázishoz képest.

A nyugalmi áramlási sebesség és a pulzatilitási index a kontroll, indometacin és naproxen fázisban

Minden vizsgálati személy rendelkezett megfelelő csontablakkal, így minden önkéntesben mindkét oldali arteria cerebri posteriort sikerült TCD-vel vizsgálni. A nyugalmi, abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebesség értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak mind a naproxen (p<0.01), mind az indometacin (p<0.01) gyógyszerhatás idején a kontroll fázishoz képest, ugyanakkor a naproxen és indometacin fázisok között nem volt szignifikáns különbség. Mindkét NSAID gyógyszerhatás idején a pulzatilitási index értéke szignifikánsan nagyobb volt (p<0.01), mint a kontroll fázisban, azonban a két NSAID fázisban a pulzatilitási indexek között szignifikáns eltérést nem találtunk (**13. táblázat**). Az áramlási sebességben és a pulzatilitási indexben észlelt fentebb jelzett eltérések az indometacin és naproxen agyi rezisztenciaerekre kifejtett vazokonstriktív hatására utatak.

A vizuális stimuláció indukálta áramlási válasz a kontroll, indometacin és naproxen fázisban

A vizuális stimuláció (olvasás) hatására az abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebesség mind a kontroll periódusban, mind a naproxen és indometacin hatás idején nőtt a nyugalmi fázishoz képest (**43. ábra**). A vizuális stimuláció során mért abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebességek tekintetében az ismételt méréses variancia-analízis a kontroll, indometacin és naproxen fázisok között szignifikáns különbséget igazolt (csoport-főhatás: p<0.01). A fenti különbségen túl a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási sebességváltozások időbeli lefolyása (vagyis a grafikon alakja) is szignifikánsan eltért a kontroll, indometacin és naproxen fázisban (csoportonkénti időbeli változás: p<0.01).

A csoportonkénti összehasonlítás során az ismételt méréses variancia-analízis azt igazolta, hogy a stimulációs fázisban mérhető abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebességek mind az indometacin (csoport-főhatás: p < 0.01), mind a naproxen (csoport-főhatás: p < 0.05)

hatás ideje alatt alacsonyabbak voltak a kontroll fázishoz képest, azonban az indometacin és a naproxen hatás alatti sebességértékekeben nem volt szignifkáns eltérés (csoport-főhatás: p=0.44; **43. ábra**).



43. ábra. A vizuális stimuláció (olvasás) kiváltotta abszolút csúcs-szisztolés áramlási sebesség változása a kontroll, naproxen és indometacin fázis során. A nyugalmi fázis utolsó 5 másodpercében mért nyugalmi csúcs-szisztolés sebesség szignifikánsan alacsonyabb volt mind az indometacin, mind a naproxen fázisban a kontroll fázishoz képest. Ismételt méréses variancia-analízissel szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és NSAID fázisok között a vizuális stimuláció alatt mérhető csúcs-szisztolés áramlási sebességek tekintetében, míg az egyes NSAID fázisok között nem volt szignifikáns eltérés.

Hogy a különböző (kontroll, indometacin, naproxen) fázisokat egymással összehasonlíthassuk, meghatároztuk a relatív sebességértékeket is úgy, hogy az aktuális áramlási sebességet minden fázisban a szemcsukás (nyugalmi fázis) utolsó 5 másodpercében mért nyugalmi áramlási sebességhez viszonyítottuk, és annak százalékában fejeztük ki (44. ábra). Ismételt méréses variancia-analízissel az abszolút sebességértékekhez hasonlóan a stimulációs fázisban mért relatív áramlási sebességértékekben is szignifikáns különbséget észleltünk a kontroll, indometacin és naproxen fázisokban (csoport-főhatás: p<0.01). A csoportonkénti összehasonlítás azt igazolta, hogy a vizuális stimuláció alatt mért relatív csúcsszisztolés áramlási sebesség az indometacin (csoport-főhatás: p<0.01) és a naproxen (csoport-főhatás: p<0.05) fázisban is alacsonyabb volt a kontroll fázishoz képest, azonban az indometacin és a naproxen hatás alatti relatív sebességértékekben nem találtunk szignifikáns eltérést (csoport-főhatás: p =0.24; **44. ábra**).


44. ábra. A vizuális stimuláció (olvasás) kiváltotta relatív csúcs-szisztolés áramlási sebességértékek a kontroll, indometacin és naproxen fázis során. Az ismételt méréses variancia-analízis szignifikáns különbséget igazolt a kontroll és NSAID fázisok között, de nem volt szignifikáns eltérés az indometacin és naproxen fázisokban mért relatív csúcs-szisztolés sebességértékekben.

A maximális relatív véráramlási sebességnövekedés (azaz a 40 másodperces stimulációs fázis során mért relatív csúcs-szisztolés áramlási sebesség legnagyobb értéke) tekintetében is szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk ha a kontroll és indometacin (p<0.01), valamint a kontroll és naproxen (p<0.02) fázisokat hasonlítottuk össze. A két nem-steroid gyulladásgátló hatása idején mért maximális relatív csúcs-szisztolés sebességértékében nem volt szignifikáns eltérés (p=0.38) (**45.ábra**).





4.2.5. Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza nyomtatott szöveg, illetve Braille írás olvasásának a hatására

A kísérletünkben arra kerestünk választ, hogy vakokban milyen a Braille olvasás során kialakuló áramlási sebességváltozás a PCA-ban a látókban nyomtatott szöveg olvasása során mért változásokhoz képest. Mivel az olvasás egy komplex stimulus (olvasáskor a betű- és szófelismerésen, vagyis a szorosan értelmezett olvasáson túl látókban fényre, vakokban pedig a kéz és ujj mozgatására, s a Braille jelek tapintására is szükség van), ahhoz, hogy önmagában az olvasás (betű- és szófelismerés) hatását vizsgálhassuk, mind a vakok, mind a látók csoportjában két különböző kísérleti protokollt használtunk.

A következő kísérleti elrendezéseket használtuk: Látó/Nyugalom-Olvasás Látó/NLC-Olvasás Vak/Nyugalom-Olvasás Vak/NLC-Olvasás

(A kísérleti elrendezések neve két részből áll. A / jel előtti első rész a résztvevők csoportját ("Látó" vagy "Vak") mutatja. A / jel után a kísérleti elrendezést jelöltük: ebben a részben az első szó ("Nyugalom" vagy "NLC") a résztvevők aktivitására utal a 20 másodpercig tartó kontroll periódusban, míg a második szó a 40 másodperc időtartamú stimulációs periódus aktivitására vonatkozik (mindig "Olvasás"). A kontroll periódusban a "Nyugalom" szó arra utal, hogy az önkéntesek csukott szemmel ültek és nem csináltak semmit, míg az NLC fázisban nem-lexikális karaktereket (NLC) olvastak, vagy tapintottak.

A "Nyugalom-Olvasás" protokoll stimulációs periódusában a betűk/szavak felismerése és a jelentéstartalommal bíró szöveg megértése mellett a látó személyeket az olvasáshoz szükséges fénystimulus is érte, a vak személyek pedig a Braille jelek felismeréséhez a kezüket és a mutatóujjukat mozgatták és a Braille jeleket tapintották. Ezzel ellentétben az "NLC-Olvasás" elrendezésben a látó alanyok nem-lexikális karaktereket néztek, míg a vak résztvevők nem-lexikális Braille-jeleket tapintottak a kontroll periódusban ("NLC" fázis), így a stimulációs fázis során csak a betű- és szófelismerés és a jelentéstartalommal bíró szöveg megértése volt az új inger. Ennek a két protokollnak a használata lehetővé tette, hogy külön-külön meghatározzuk a "fénystimulus + betű- és szófelismerés" és a "kéz/ujjmozgás + betű- és szófelismerés" kombinált hatását látó és vak személyekben ("Nyugalom-Olvasás" protokoll), valamint a "csak betű- és szófelismerés" hatását látó és vak önkéntesekben ("NLC-Olvasás" protokoll).

Nyugalmi hemodinamikai paraméterek és vérgáz értékek látókban és vakokban

A látó és a vak csoportban az életkor, a férfiak és nők aránya, a vérnyomás, a pulzusszám és a vérgáz értékek hasonlóak voltak (**14. táblázat**).

Látók	Vakok
22 ± 4	23 ± 5
7/3	8/3
114 ± 8	116 ± 9
76 ± 5	74 ± 6
74 ± 5	75 ± 6
97 ± 2	98 ± 2
69 ± 3	70 ± 2
36 ± 2	35 ± 3
7.42 ± 0.03	7.43 ± 0.03
	Látók 22 ± 4 7/3 114 ± 8 76 ± 5 74 ± 5 97 ± 2 69 ± 3 36 ± 2 7.42 ± 0.03

14. táblázat A látó és a vak önkéntesek jellemzői

Az abszolút áramlási sebesség kiindulási értékei

A kiindulási csúcs-szisztolés áramlási sebesség a PCA-ban a kontroll fázis utolsó 5 másodpercében mérve lényegesen alacsonyabb volt a vak, mint a látó csoportban. Ez a különbség a két csoport között megfigyelhető volt a "Nyugalom" ("Nyugalom-Olvasás" protokoll) és az "NLC" ("NLC-Olvasás" protokoll) fázisban egyaránt (**15. táblázat**; **46.A és 46.B ábra**). A látó csoporton belül (**46.C ábra**) magasabb kiindulási áramlási sebesség (p<0,001) volt mérhető az "NLC" fázisban (a résztvevők szemei nyitva voltak és nem lexikális karaktereket "olvastak"), mint a "Nyugalom" időszakban (az alanyok szemei csukva voltak). A vak csoportban (**46.D ábra**) a kiindulási áramlási sebességek a PCA-ban az "NLC" (a résztvevők nem lexikális karakterek Braille jeleit tapintották) és a "Nyugalom" fázis (a résztvevők ültek és nem csináltak semmit) során hasonlóak voltak (p = 0,7851).

15. táblázat Kiindulási csúcs-szisztolés áramlási sebességértékek vak és látó személyekben a
kontroll periódus utolsó 5 másodpercében a "Nyugalom" és "NLC" időszakban

Időszak	Áramlási sebesség látó személyekben	Áramlási sebesség vak személyekben	
Nyugalom	$59.2 \pm 7.7 \text{ cm/s}$	$48.5 \pm 7.9 \text{ cm/s}$	$p < 0.01^{a}$
NLC	$64.8 \pm 6.5 \text{ cm/s}$	$49.6 \pm 6.6 \text{ cm/s}$	p <0 .01 ^a
	$p < 0.001^{b}$	$p = 0.7851^{b}$	

^a A látó és a vak személyek adatainak összehasonlítása variancia-analízissel

^b A Nyugalom és az NLC fázis adatainak összehasonlítása egy csoporton belül kétmintás tpróbával

Abszolút áramlási sebességváltozások a PCA-ban olvasás során

A stimulációs fázisban az olvasás az abszolút áramlási sebesség szignifikáns növekedését eredményezte mindkét csoportban és mindkét kísérleti protokollban. Ez azt jelenti, hogy a vakok és látók esetében is, mind a "Nyugalom-Olvasás", mind az "NLC-Olvasás" protokollban az olvasás során az áramlási sebesség szignifikánsan magasabb volt (p<0,001), mint a kiindulási áramlási sebesség a "Nyugalom" vagy az "NLC" szakaszban (**46. ábra**).



46. ábra A "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokollok során mért abszolút áramlási sebességváltozások a látó és a vak résztvevőkben. Az A és a B ábra ugyanazokat az adatokat tartalmazza, mint a C és a D ábra, csak különböző összehasonlításban. Az A és a B ábra a látó és a vak csoport adatainak összehasonlítását mutatja külön a "Nyugalom-Olvasás" (A) és az "NLC-Olvasás" (B) protokollban, míg a C és a D ábra az áramlási sebességértékeket szemlélteti a "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokoll során külön a látó (C) és a vak (D) csoportban. A függőleges szaggatott vonal a kontroll fázis végét és a stimulációs fázis kezdetét jelöli. Az A és a B ábra a látó személyek esetén magasabb abszolút áramlási sebességértékeket jelez a vak személyekhez képest mind a kontroll, mind a stimulációs fázisban. A különböző protokollok összehasonlítása a látó (C) és a vak (D) csoportokban azt szemlélteti, hogy bár a kiindulási áramlási sebesség magasabb volt a látó résztvevőkben az "NLC" fázis során, mint a "Nyugalom" fázisban (C), a stimulációs fázis során már nem volt különbség a két protokoll alatt mért áramlási sebességértékekben. Vak személyekben (D) az abszolút áramlási sebességértékek nem különböztek a "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokollban sem a kontroll, sem a stimulációs fázisban. A szórást (SD) jelző vonalak a látó csoportban (A és B ábra) és a "Nyugalom-Olvasás" fázisban (C és D ábra) felfelé irányulnak, míg a vak csoportban (A és B ábra) és az "NLC-Olvasás" fázisban (C és D ábra) lefelé. Az összehasonlíthatóság miatt ugyanazt a beosztást használtuk minden grafikonon. (Az áramlási sebességértékek a két PCA-ban mért értékek átlagát jelzik.)

Az ismételt méréses variancia-analízis mindkét kísérleti elrendezésben ("Nyugalom-Olvasás" és "NLC-Olvasás" protokollok) szignifikáns csoport-főhatást (látó vs. vak, p<0,001) igazolt, vagyis az áramlási sebesség a stimulációs fázis során a látókban szignifikánsan magasabb volt, mint a vakokban (**46.A és 46.B ábra**). A csoportonkénti időbeli változás szignifikánsan különbözött a "Nyugalom-Olvasás" protokoll során (**46.A ábra**, p<0,001), jelezve, hogy az áramlási sebességváltozások mintázata a stimulációs fázisban különbözött a látó és a vak önkéntesek között. Ezzel szemben az "NLC-Olvasás" kísérleti elrendezésben nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportonkénti időbeli változás tekintetében (**46.B ábra**, p = 0,9925), vagyis a csúcs-szisztolés áramlási görbék lefutása a 40 másodperces stimulációs periódus alatt hasonló volt a látó és a vak csoportban.

A látó csoporton belüli (**46.C ábra**) áramlási sebességváltozások összehasonlítása a két kísérleti elrendezésben (Látó/Nyugalom-Olvasás vs. Látó/NLC-Olvasás) azt mutatta, hogy az áramlási sebességértékek a stimulációs fázisban hasonlóak voltak (csoport-főhatás: p = 0,649), míg az áramlási sebességváltozások mintázata különbözött (csoportonkénti időbeli változás: p<0,001). A vak résztvevőkben (**46.D ábra**) sem a csoport-főhatás (p = 0,896), sem a csoportonkénti időbeli változás (p = 0,788) nem mutatott szignifikáns különbséget a két kísérleti elrendezésben, azt jelezve, hogy sem a sebességértékek, sem az áramlási sebesség görbék mintázata nem különbözött a két protokoll stimulációs fázisa során (Vak/Nyugalom-Olvasás vs. Vak/NLC-Olvasás).

Relatív áramlási sebességváltozások olvasás során

Annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk az olvasás hatását a különböző csoportok és kísérleti elrendezések között, az abszolút áramlási sebességértékeket a megfelelő kiindulási értékekhez (a megfelelő kontroll fázis utolsó 5 másodpercében átlagolt sebességértékekhez) viszonyítottuk és a mindenkori sebességértékeket a kiindulási áramlási sebességek százalékos értékében fejeztük ki (47. ábra). A kiindulási adatokkal összehasonlítva a kétmintás t-próba szignifikánsan magasabb relatív áramlási sebességértékeket igazolt (p<0,001) a stimulációs fázis során mindkét csoportban és mindkét kísérleti protokollban. Az ismételt méréses variancia-analízis szignifikáns csoport-főhatást (látó vs. vak, p<0,001) igazolt és szignifikáns eltérés volt a csoportonkénti időbeli változás tekintetében is (p<0,001) a látó és a vak csoport között a "Nyugalom-Olvasás" protokoll során (47.A ábra). Ez azt jelenti, hogy ebben a kísérleti elrendezésben ("Nyugalom-Olvasás" protokoll) nemcsak az abszolút, hanem a relatív áramlási sebességértékek, valamint a relatív áramlási sebességváltozások mintázata is különbözött a látó és a vak személyekben. Ezzel ellentétben, a másik kísérleti elrendezésben ("NLC-Olvasás" protokoll) az ismételt méréses variancia-analízis nem jelzett szignifikáns különbséget sem a csoport-főhatásban (látó vs. vak, p = 0,449), sem a csoportonkénti időbeli változás tekintetében (p = 0.993) a vak és a látó önkéntesek között (**47.B ábra**). Ez arra utal, hogy az "NLC" fázis során mért kiindulási áramlási sebességre normalizált relatív áramlási sebességértékek hasonlóak voltak a vak és a látó csoportban szövegolvasás során, illetve az "NLC-Olvasás" kísérleti szakaszban a relatív áramlási sebességértékeken túl a relatív áramlási sebesség görbék lefutása is hasonló volt a két csoportban. Adataink azt jelzik, hogy míg a fénystimulus + olvasás (betű- és szófelismerés) látókban nagyobb áramlási sebességváltozást okozott, mint a kéz/ujjmozgás + Braille olvasás a vakokban (Nyugalom-Olvasás protokoll), addig önmagában az olvasás (betű- és szófelismerés) hatására létrejövő sebességváltozás mértéke (NLC-Olvasás protokoll) nem tért el a két csoportban.



47. ábra. A "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokollok alatt a PCA-ban mért relatív áramlási sebességváltozások látókban és vakokban. Az A és a B ábra ugyanazokat az adatokat tartalmazza, mint a C és a D ábra, csak különböző összehasonlításban. Az A és a B ábra a látó és a vak csoport adatainak összehasonlítását mutatja külön a "Nyugalom-Olvasás" (A) és az "NLC-Olvasás" (B) protokoll során, míg a C és a D ábra a relatív áramlási sebességváltozást szemlélteti a "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokoll alatt külön a látó (C) és a vak (D) csoportban. A függőleges szaggatott vonal a kontroll fázis végét és a stimulációs fázis kezdetét jelöli. Az A ábra magasabb relatív áramlási sebességértékeket jelez a látó személyekben (nyomtatott szöveg olvasása), mint a vak személyekben (Brailleolvasás) a "Nyugalom-Olvasás" protokoll során, vagyis amikor a relatív áramlási sebességeket a "Nyugalom" fázis alapértékeire normalizáltuk. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a látó és a vak csoport között az "NLC-Olvasás" protokoll során, amikor a relatív értékeket a stimulációs fázisban (olvasás) az "NLC" fázis alapértékeihez (B) viszonyítottuk. A látó személyekben (C) a relatív sebesség nagyobb volt a stimulációs fázis során abban az esetben, amikor azokat a "Nyugalom" fázis értékeire normalizáltuk, mint amikor az "NLC" fázis adataihoz viszonyítottuk. Ezzel szemben, a vak személyekben (D) a relatív változások hasonlóak voltak a két kísérleti elrendezés stimulációs fázisában. A szórás (SD) vonalai a látó csoportban az A ábrán, a vak csoportban a B ábrán, és a "Nyugalom-Olvasás" fázisban (C és D ábra) felfelé irányulnak, míg a vak csoportban az A ábrán, a látó csoportban a B ábrán, és az "NLC-Olvasás" fázisban (C és D ábra) lefelé. Az összehasonlíthatóság miatt ugyanazt a beosztást használtuk minden grafikonon.

A látó csoporton belül a stimulációs fázisban mért (**47.C ábra**) relatív áramlási sebességértékek a két kísérleti elrendezésben (Látó/Nyugalom-Olvasás vs. Látó/NLC-Olvasás) szignifikánsan különböztek ("Nyugalom-Olvasás" vs. "NLC-Olvasás"; csoport-főhatás: p<0,001), és a két kísérleti elrendezés során mért relatív sebességértékek időbeli változása is szignifikánsan eltért (p<0,001). Ezzel ellentétben, vakokban (**47.D ábra**) a két kísérleti protokoll (Vak/Nyugalom-Olvasás vs. Vak/NLC-Olvasás) stimulációs fázisában kapott eredmények között sem a csoport-főhatásban ("Nyugalom-Olvasás" vs. "NLC-Olvasás"; p = 0,889), sem a relatív sebességértékek időbeli változásában (p = 0,718) nem találtunk szignifikánsa különbséget. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy míg látókban a relatív áramlási sebességértékek és az áramlási sebesség görbék mintázata a szövegolvasás során szignifikánsan különböztek a két kísérleti elrendezés között (Látó/Nyugalom-Olvasás vs. Vak/NLC-Olvasás), addig ezek az értékek a vakokban a Vak/Nyugalom-Olvasás vs. Vak/NLC-Olvasás protokollok során mérve hasonlóak voltak. Adataink arra utalnak, hogy míg látókban a fénystimulus jelentős hatást gyakorolt a PCA-ban mérhető áramlási sebességváltozásra, addig vakokban azt a kéz/ujjmozgás számottevően nem befolyásolta.

Maximális relatív áramlási sebességváltozások olvasás során

A maximális relatív áramlási sebességváltozás meghatározásához a 40 másodpercig tartó stimulációs fázis során előforduló legmagasabb értéket vettük alapul minden önkéntesnél mind a "Nyugalom-Olvasás", mind az "NLC-Olvasás" protokollban. A relatív áramlási sebesség maximális növekedése a "Nyugalom" fázishoz viszonyítva a látó csoportban (Látó/Nyugalom-Olvasás) szignifikánsan nagyobb volt, mint amit a Látó/NLC-Olvasás protokoll során mértünk látó vagy a Vak/Nyugalom-Olvasás protokoll során vak személyekben (**48. ábra**). Ezzel szemben vakokban a két kísérleti elrendezés során mért relatív áramlási sebességértékek maximális növekedésében nem volt szignifikáns eltérés, és az "NLC-Olvasás" protokoll alatt a vakokban és a látókban mért maximális relatív sebességváltozás is hasonló volt. Bár az olvasás által kiváltott MCA áramlási sebességek maximális növekedései az MCA-ban mind a vak, mind a látó alanyokban ($3,3\% \pm 1,4\%$, illetve $3,6\% \pm 1,5\%$) szignifikánsan alacsonyabbak voltak (p<0,01), mint a PCA-ban.

4.1.5. VEP paraméterek

Míg a VEP paraméterek a látó alanyokban a normális tartományokban voltak, vak személyekben VEP szignált nem tudtunk detektálni.



48. ábra. Maximális relatív áramlási sebességnövekedés a látó és a vak csoportban a két kísérleti elrendezés során. A látó személyekben a nyomtatott szöveg olvasása által okozott maximális relatív áramlásnövekedés a "Nyugalom" fázishoz viszonyítva (25.9%) szignifikánsan nagyobb volt, mint az "NLC" fázishoz viszonyított (8.1%) érték. A vak személyek esetében a "Nyugalom" és az "NLC" fázishoz viszonyított (10.0 illetve 10.5%) maximális relatív áramlási sebességnövekedés hasonló volt. A fénystimulus + olvasás (betűés szófelismerés) látó személyekben (Látó/Nyugalom-Olvasás) hozzávetőlegesen háromszor nagyobb áramlásnövekedést okozott, mint önmagában a szigorú értelemben vett olvasás, vagyis a betű- és szófelismerés (Látó/NLC-Olvasás). Ezek az adatok azt mutatják, hogy önmagában a betű- és szófelismerés a PCA áramlásnövekedésének csupán egyharmadáért volt felelős a látó személyekben, míg a további áramlásváltozást a fénystimulus okozta. Míg a fénystimulus + betű- és szófelismerés látókban lényegesen nagyobb sebességnövekedést okozott, mint a kéz/ujjmozgás + Braille olvasás vakokban (Nyugalom-Olvasás protokoll), addig önmagában az olvasás, azaz a betű- és szófelismerés (NLC-Olvasás protokoll) hasonló áramlási sebességnövekedést eredményezett a két csoportban. A látó és a vak személyek adatainak összehasonlításához variancia-analízist alkalmaztunk, míg egy csoporton belül a "Nyugalom-Olvasás" és az "NLC-Olvasás" protokollok során nyert adatok összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEINEK MEGBESZÉLÉSE

Bár az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb erőfeszítések történtek az ischaemiás stroke rekanalizációs terápiájának a mind szélesebb körű alkalmazására, a lakosság felvilágosítása, a mentőkkel történő újabb és újabb konzultációk, a kórházi személyzet képzése, stroke egységek létrehozása és telestroke programok bevezetése ellenére az országos adatokat figyelembe véve ez a kezelési módszer még a stroke kezelésben élenjáró országokban is 20% alatt van (Ferrari és mtsai., 2013; Cheng és mtsai., 2015). Ez azt jelenti, hogy az akut strokeban szenvedő betegek 80%-a továbbra is csak a hagyományos, nem rekanalizációs alapú kezelést kapja. Emiatt továbbra is létjogosultsága van a permanens cerebrális ischaemia területén tett erőfeszítéseknek, kutatásoknak.

Jól ismert a magas vérnyomás negatív hatása az érrendszerre, ezen belül is az agyat ellátó arteriákra. A hipertenzió megváltoztatja az erek strukturáját, károsítja a vazoreguláció folyamatát és az agyi vérellátás csökkentése révén növeli az ischaemiás stroke rizikóját (Iadecola és Davisson, 2008). Nem meglepő tehát, hogy a magas vérnyomás megfelelő kezelése jelentősen képes csökkenteni a stroke rizikót. Nincs kétség afelől, hogy az elmúlt évtizedekben a hipertonia kezelés első számú gyógyszerei a renin-angiotenzin rendszerre ható szerek voltak. Ezek közül is kiemelkednek az ACE gátlók és az angiotenzin 1-es típusú receptorát blokkoló gyógyszerek (Chrysant, 2012), melyeket egyre szélesebb körben használnak a hipertónia kezelésében.

5.1.1. Az anigotenzin hatása permanens ischaemiás stroke-ban

Az agiotenzin II (AII) egy erős vazokonstriktor tulajdonsággal rendelkező molekula, mely az angiotenzinogénből keletkezik hasítás útján a renin és az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hatására. A renin-angiotenzin rendszer fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer működésében és a folyadék háztartás szabályozásában, emellett hatással van az ischaemia indukálta neuronális károsodásra is. Az ACE gén polimorfizmusa magas ACE szérum koncentrációt idézhet elő, mely a fokozott angiotenzin produkció révén fokozza mind az ischaemiás stroke rizikóját, mind az ischaemiás károsodás súlyosságát (Catto és mtsai., 1996; Doi és mtsai., 1997). Ezzel szemben az ACE inhibitorok alkalmazása, vagy az angiotenzin 1-es típusú receptorának (AT1) hosszútávú blokkolása javítja a neurológiai kimenetelt és csökkenti az infarktus térfogatát kísérletes fokális ischaemiában (Werner és mtsai., 1991; Yabuuchi és mtsai., 2000). Az angiotenzin permanens ischaemiás stroke-ra gyakorolt hatását vizsgáló kísérletünkben az volt a célunk, hogy az angiotenzin és az AT1 receptor szerepét pontosabban tisztázzuk cerebrális ischaemiában. Célunk volt annak a megválaszolása is, hogy az AT1 receptor hiánya a cerebrális hemodinamikára kifejtett jótékony hatásán keresztül javítja a stroke kimenetelét, vagy egyéb, ettől független hatása is van. A kísérletben krónikusan magas angiotenzin szinttel élő angiotenzinogént overexpresszáló (TGM123), valamint angiotenzin AT1 receptor hiányos transzgén egerekben (AT1 knock-out) vizsgáltuk az ischaemia súlyosságát, az ischaemiás lézió és a penumbra nagyságát 1 és 24 órás permanens MCA okklúzió során. Mivel az agyban AT1 és AT2 receptorok találhatók mind az agyi kiserekben (Speth és Harik, 1985; Tsutsumi és Saavedra, 1991), mind a neuronokban (Saavedra, 1999, de Gasparo és mtsai., 2000), csupán in vivo kísérlettel nem igazolható, hogy az angiotenzin a hatását csak a vaszkuláris rendszeren fejti ki, vagy a neuronokon jelenlévő receptorokon keresztül is hat. Hogy a neuronális AT1 receptor szerepét tisztázhassuk, az in vivo vizsgálatok mellett vaszkuláris hatások által nem befolyásolt in vitro kísérletet is végeztünk, melyben AT1 hiányos egerek és vad típusú egerek embrióiból készített primer neuronális sejtkultúrában idéztünk elő ischaemiás károsodást úgy, hogy a sejtkultúrákat oxigén-glükóz deprivációnak tettük ki 120 percre.

Az angiotenzin hatása az ischaemiás stroke kimenetelére

Vizsgálataink egyértelműen igazolták az angiotenzin káros, illetve az angiotenzin 1-es típusú receptor hiányának a jótékony hatását az ischaemiás stroke kiterjedésére és súlyosságára. Eredményeinkkel összhangban, az angiotenzin kártékony hatását támogatta az a korábbi megfigyelés is, mely szerint 1 órás MCAO után angiotenzinogén hiányos transzgén egerekben jobb volt a kollaterális keringés és kisebb kiterjedésű volt az ischaemiás lézió, mint a kontroll társaikban (Maeda és mtsai., 1999). Patkányokon végzett farmakológiai vizsgálatok, melyek során az angiotenzin szintézist, vagy az angiotenzin 1-es típusú receptorát blokkolták, szintén az angiotenzin ischaemiás stroke-ra gyakorolt kedvezőtlen szerepét igazolták (Werner és mtsai., 1991; Yabuuchi és mtsai., 1999; Dai és mtsai., 1999; Nishimura és mtsai., 2000; Mark és mtsai., 2000). Az angiotenzin ischaemiás stroke kimenetelét kedvezőtlenül befolyásoló hatása többek között az angiotenzin okozta vazokonstrikcióval, az agyi erek szerkezetére gyakorolt hatásával és ezen keresztül a kollaterális erek megváltozott vazoreaktivitásával magyarázható (Saavedra, 2005).

A rendelkezésre álló adatok szerint az angiotenzin hipertenziót, vazokonstrikciót, az ér simaizomsejtjeinek a proliferációját és az adventitia megvastagodását okozó hatása az AT1 receptoron keresztül érvényesül (Scheidegger és mtsai., 1997; Chung és mtsai., 1999; Lorell és mtsai., 1999). Spontán hipertóniás patkányokban az AT1 receptor blokkolásával sikerült normalizálni a károsodott autoregulációt az ischaemiás zóna perifériáján, mely az agyi ischaemiás károsodás mértékének csökkenését eredményezte (Nishimura és mtsai., 2000). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a folyamatosan magasabb angiotenzin szint miatti hipertenzió vaszkuláris hipertrófiát, a vérnyomás-agyi vérátáramlás autoregulációs görbe magasabb vérnyomás értékek irányába történő eltolódását idézi elő (Barry és mtsai., 1982). Feltehetően ez volt az oka annak, hogy a **kísérletünkben használt angiotenzinogént overexpresszáló állatokban az ischaemia súlyosabb, az ATP hiányos lézió nagyobb, s a penumbra kisebb volt, mint a vad típusú egerekben. Ezzel szemben az AT1 receptor hiányos egyedekben az ischaemia enyhébb, az ATP hiányos terület kiterjedése kisebb, s a penumbra mérete nagyobb volt, mint a kontroll állatokban.** Az in vitro végzett kísérletek ugyanakkor azt jelezték, hogy az AT1 receptor mediálta kedvezőtlen angiotenzin hatás nem írható csak a vaszkuláris hatás, nevezetesen a vazokonstrikció és a simaizomsejtek proliferációjának a rovására. A vaszkuláris tényezőktől és hemodinamikai hatásoktól mentes primer neuronális sejtkultúrában is igazolódott ugyanis, hogy az AT1 receptor hiánya illetve gyógyszerrel történő blokkolása rezisztensebbé tette a neuronokat az átmeneti oxigén és glükóz hiánnyal szemben.

Vizsgálataink eredményei, melyek szerint az AT1 receptor hiánya, vagy annak blokkolása neuroprotektív hatású az ischaemiával/hipoxiával szemben mind in vivo, mind in vitro, azt sugallják, hogy **az AT1 receptor blokádja egy ígéretes neuroprotektív stratégia lehet a klinikai gyakorlatban akut ischaemiás stroke esetén**. Kísérletes adataink magyarázatul szolgálhatnak arra is, hogy az ACE gén polimorfizmus, vagy a reninangiotenzin rendszeren ható farmakológiai szerek hogyan befolyásolhatják a neurológiai kimenetelt és a stroke betegek túlélését (Catto és mtsai., 1996; Doi és mtsai., 1997; Mark és mtsai., 2000). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a AT1 receptor hiányból származó kedvező változások csak a rövid időtartamú ischaemiás stroke-ban (1 órás MCAO) voltak megfigyelhetők, s a kedvező hatás már 24 óra múlva nem volt kimutatható. Emellett nyilván nem várható, hogy a már kialakult vaszkuláris hipertrófia és a károsodott autoreguláció az AT1 receptor blokádjával már az akut ischaemiás stroke időszakában helyreállítható lenne.

Összefoglalás, következtetés

Megállapítottuk, hogy fokális cerebrális ischaemiában a magas angiotenzinogén szint súlyosabb ischaemiát, kisebb penumbrát, s nagyobb infarktust, míg az AT1 receptor blokkolása enyhébb ischaemiát, nagyobb penumbrát és kisebb infarktust eredményezett. Az angiotenzin AT1 receptoron keresztül közvetített kedvezőtlen hatásai csak részben voltak magyarázhatók hemodinamikai változásokkal, mivel az AT1 receptor hiánya in vitro is hozzájárult a neuronok ischaemiával szembeni rezisztenciájához.

Adataink arra hívják fel a figyelmet, hogy az angiotenzin okozta káros hatásokat a betegellátásban is szem előtt kell tartani, hisz a stroke szempontjából nagy rizikójú betegekben az ACE gátlók, vagy az AT1 receptor blokkolók időben elkezdett adásával az ischaemiás stroke rizikója és az agyi ischaemiás károsodás súlyossága mérsékelhető (Chrysant, 2012).

5.1.2. A rekanalizációs terápia fejlődése akut ischaemiás stroke-ban

Az utóbbi évtizedekben több és több vizsgálat igazolta, hogy **az akut ischaemiás stroke kezelésében a legkedvezőbb hatás a megfelelő időablakon belül elkezdett mihamarabbi rekanalizációs terápiától várható**. Az igazi áttörést a NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) tanulmány hozta meg, melynek eredményeit 1995-ben publikálták (NINDS tPA Study Group, 1995), s mely igazolta, hogy az ischaemiás stroke kezdetétől számított 3 órán belül elkezdett intravénás rt-PA kezelés a beválogatási és kizárási szempontok szigorú betartása esetén javítja az ischaemiás stroke kimenetelét. A következő tanulmányok, az ECASS (European Cooperative Acute Stroke Study; Hacke és mtsai., 1995), az ECASS II (Hacke és mtsai., 1998) és az ATLANTIS (Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke; Clark és mtsai., 1999) vizsgálatok voltak. Ezek a tanulmányok 0-6 órás terápiás ablakban vizsgálták a szisztémás rt-PA kezelés hatását, s bár ebben az időintervallumban adva az rt-PA kedvező hatását nem tudták igazolni, mégis rámutattak arra, hogy a 4.5 órán belül adott intravénás rt-PA hatékony lehet (Hacke és mtsai., 2004). A következő trombolízis study az ECASS III volt, mely sikeresnek bizonyult, s igazolta, hogy bizonyos megszorítások mellett az ischaemiás stroke kezdete után 3.0-4.5 óra között adott rtPA is hatékony az ischaemiás stroke kimenetelének a javításában (Hacke és mtsai., 2008). Az intravénás kezeléssel párhuzamosan egyre újabb vizsgálatok eredményei láttak napvilágot, melyek az intraarteriális rt-PA adás és a mechanikus trombektómia hatását vizsgálták (Przybylowski és mtsai., 2014). Az áttörést a 2015. év hozta meg, amikor számos olyan tanulmány eredményét publikálták, melyek a mechanikus trombektómia biztonságosságát és hatékonyságát igazolták (Berkhemer és mtsai., 2015; Goyal és mtsai., 2015; Campbell és mtsai., 2015; Saver és mtsai. és mtsai., 2015; Jovin és mtsai., 2015). Ezen tanulmányok eredményei alapján mára egyértelművé vált, hogy a 6-8 órán belül elkezdett mechanikus trombektómia révén történő thrombus, vagy embolus eltávolítás nagy intrakraniális artéria elzáródása esetén az ischaemiás stroke leghatékonyabb terápiája (Powers és mtsai., 2015; Donnan, 2015). Természetesen a betegekben végzett vizsgálatokat számos állatkísérlet előzte meg, melyben az átmeneti agyi fokális ischaemia hatását tanulmányozták, s melyek eredményei a rekanalizációs terápia elterjedésével fokozott hangsúlyt kaptak.

Vizsgálataink tervezésénél szem előtt tartottuk, hogy a jövőben az MR vizsgálatok szerepe a különböző MR szekvenciák révén nyert információknak köszönhetően ischaemiás stroke-ban felértékelődik, s a személyreszabott kezelés terjedésével mind a rekanalizációs kezelésre alkalmas betegek szelekciójában, mind a kezelés megtervezésében és a stroke kimenetel becslésében felbecsülhetetlen segítséget adhat, s egyben a kezelés költséghatékonyságát is javíthatja.

5.1.3. Az ADC követése valamint az MR és metabolikus paraméterek kapcsolatának vizsgálata átmeneti agyi fokális ischaemiában

Állatkísérletes munkáink egy részében az átmeneti agyi ischaemia hatását reverzibilis MCAO modellben MR vizsgálatok segítségével tanulmányoztuk. A vizsgálatokhoz a kísérleti állatokat úgy operáltuk meg és készítettük elő, hogy azokat az a. cerebri media elzárásához, majd megnyitásához, vagyis az ischaemia és a reperfúzió előidézéséhez ne kelljen az MR készülékből kivenni (Kohno és mtsai., 1995). Ez lehetőséget adott arra, hogy kontroll MR vizsgálatokat végezzünk, s pixel analízist használva pixelenként meghatározzuk a kontroll adatokhoz viszonyított relatív perfúziós szignál-intenzitást, a diffúzió súlyozott felvételekből relatív ADC térképet, a T2 súlyozott felvételekből pedig relatív T2 térképet készítsünk az ischaemia és a reperfúzió során. A vizsgálatok lehetővé tették, hogy az a. cerebri media okklúzió és a több órás reperfúzió alatt ugyanabban a kísérleti állatban kövessük az ischaemia és a reperfúzió MR paraméterekre gyakorolt hatását. Mivel a kísérlet során az élettani értékeket monitoroztuk és azokat a kísérlet alatt végig a fiziológiás tartományban tartottuk, az esetleges hipotenzió, hipo- vagy hipertermia, hipoxia és hiperkapnia kedvezőtlen hatása kizárható volt.

Az 1990-es években tranziens cerebrális ischaemia során egerekben és patkányokban végzett végpont tanulmányokban igazolták, hogy a rövid időtartamú cerebrális ischaemia alatt jelentkező energiametabolizmus zavara a reperfúzió korai stádiumában javul vagy rendeződik, azonban a recirkuláció későbbi szakaszában másodlagosan rosszabbodik (Hata és mtsai., 2000; Folbergrova és mtsai. 1995). Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy rövid időtartamú átmeneti agyi ischaemiában az energiametabolizmus végső összeomlását, s a végső neuronális károsodást megelőzi egy, a korai reperfúzió idején részlegesen vagy teljesen rendeződő energiametabolizmus. Mivel a víz ADC (apparent diffusion coefficient) értéke az agyszövet energiastátuszára érzékenyen reagál (Davis és mtsai., 1994, Roussel és mtsai., 1995), az agyszövet energiametabolizmusa és annak dinamikája ismételt diffúziósúlyozott vizsgálatokkal (DWI) és a diffúziós értékekből számított ADC értékekkel jól követhető. Számos DWI tanulmány igazolta, hogy rövid időtartamú átmeneti agyi ischaemiában az ADC érték a reperfúzió korai fázisában rendeződik (Dijkhuizen és mtsai., 1998; Kastrup és mtsai., 1999; Li és mtsai., 1999, van Lookeren Campagne és mtsai., 1999, Pierpaoli és mtsai., 1996; Mintorovitch és mtsai., 1991; Zarow és mtsai., 1995; Ning és mtsai., 1999; Tuor és mtsai., 1998). Az ADC érték javulása a reperfúzió korai szakaszában szembetűnő hasonlóságot mutat a röviddel a recirkulációt követően bikoémiai vizsgálatokkal igazolt ATP szint normalizálódásával (Hata és mtsai., 2000; Folbergrova és mtsai. 1995). Mivel azonban a legtöbb MR kísérletet 2-5 órás reperfúziót követően befejezték, vagy megszakították, a tanulmányunk előtt csak kevés tanulmány foglalkozott az energiametabolizmus és az ADC másodlagos rosszabbodásával (Dijkhuizen és mtsai., Li és mtsai., 1999, van Lookeren Campagne és mtsai., 1999; Zarow és mtsai., 1995; Ning és mtsai., 1999; Tuor és mtsai., 1998). Emellett, előttünk egy tanulmány sem követte folyamatosan az MR paramétereket az ADC másodlagos rosszabbodásának a várható időpontjában, s így az energiametabolizmus másodlagos károsodásának az idején a különböző MR paraméterek alakulására vonatkozó következtetéseket sem sikerült levonni. Tanulmányunk célja az volt, hogy az ADC dinamikáját folyamatosan kövessük 1 órás MCAO és 10 órás reperfúzió alatt. Az ADC érték mellett a perfúziós szignál intenzitást és a T2 értékeket is óránként ellenőriztük.

Az ischaemia végén mért relatív ADC érték, mint a szöveti kimenetel prediktora

Az egyórás MCAO-t követő 10 órás reperfúzió során igazoltuk, hogy a reperfúzió első két órájában az ADC érték jelentősen javult, majd a reperfúzió későbbi időszakában ismét csökkent, mely jelenséget az ADC másodlagos rosszabbodásaként nevez a tudományos irodalom. Eredményeink igazolták, hogy az ADC másodlagos csökkenését a T2 relaxációs idő növekedése a perfúzió első óráiban megelőzte, s bizonyítottuk azt is, hogy az ADC másodlagos rosszabbodásának a hátterében nem állt szignifikáns hipoperfúzió. A kísérlet során a reperfúzió első két órájában tapasztalt ADC javulását és annak a későbbi reperfúzió idején észlelt rosszabbodását a relatív ADC 80%-os értéke alapján határoztuk meg: a kontroll érték 80%-a alá csökkenő relatív ADC-t rosszabbodásként, az ezt meghaladó relatív ADC-t javulásként értékeltük. Ezt szem előtt tartva a pixel analízis során az MCAO végére a 80% alá csökkenő relatív ADC-vel jellemezhető pixeleket a reperfúzió alatti ADC változások alapján 3 csoportba soroltuk:

- "helyreállt" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, s mindvégig ezen érték fölött maradt a reperfúzió későbbi időszakában is;
- "másodlagos rosszabbodást mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték a reperfúzió első 2 órájában elérte a legalább 80% relatív ADC értéket, de a reperfúzió későbbi időszakában ismét 80% alá csökkent;
- "javulást nem mutató" szövet: pixelek, melyekben a relatív ADC érték mindvégig 80% alatt volt.

Természetesen tudatában voltunk annak, hogy az ADC különböző irányú változásai nem határozhatók meg egy élesen meghúzott relatív ADC érték által, de a relatív ADC 80%-os értékére azért esett a választás, mert a korábbi, fokális agyi ischaemia akut szakában végzett vizsgálatok jó korrelációt mutattak a 80% alatti relatív ADC és az energiametabolizmus károsodása (ATP hiány) között (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). A 80%-os relatív ADC küszöbértéket nemcsak a pixelek fent ismertetett felosztására, hanem a féltekei lézió térfogat meghatározására is használtuk.

Eredményeink azt mutatták, hogy az ADC érték az 1 órás fokális cerebrális ischaemia során károsodást szenvedett terület több mint 4/5-ében javult, s az ADC másodlagos rosszabbodása 2-3 órával a reperfúzió indukcióját követően kezdődött. Hozzánk hasonlóan korábban mások is beszámoltak az ADC értékek javulásáról majd másodlagos rosszabbodásáról a reperfúzió alatt (van Lookeren Compagne és mtsai., 1999; Li és mtsai., 2000), azonban van Lookeren Campagne és mtsai. az ADC másodlagos rosszabbodásának idejét a reperfúzió utáni 6. órától tapasztalta. Az ADC eltérő időbeli változásában szerepet játszhatott mind az általuk választott rövidebb időtartamú ischaemia, mind az eltérő fokális ischaemia modell.

Az ischaemia végén mért relatív ADC értékeket a különböző pixel alcsoportokban analizálva igazoltuk, hogy a "javulást nem mutató" szöveti régióban szignifikánsan alacsonyabb volt az ischaemia végén mért ADC érték, mint azokban a területekben, ahol az ADC javult a korai reperfúzió idején, vagyis az ischaemia végén észlelt alacsony ADC érték egyértelműen rossz kimenetelt jelzett. Ugyanakkor az ischaemia végi relatív ADC érték nem segített annak a meghatározásában, hogy a reperfúzió későbbi szakában mely pixelek fognak a "másodlagos rosszabbodást mutató" illetve a "helyreállt" csoportba tartozni. Eredményeink összhangban vannak Hasegawa és mtsai. megfigyeléseivel (1994), akik csak abban a régióban tapasztalták az ADC normalizálódását a reperfúzió alatt, melyben nem volt súlyos ADC csökkenés az ischaemia fázisában. Az a megfigyelésünk, mely szerint a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelek az ischaemia végén mért lézió több mint 50%-át foglalták magukba, megerősíti Dijkhuizen és mtsai. (1998), valamint Li és mtsai. (1999) eredményeit, akik azt a következtetést vonták le, hogy a reperfúzió későbbi szakaszában jelentkező másodlagos károsodás miatt a korai reperfúzió idején tapasztalt ADC normalizálódása alapján nem lehet megjósolni az ischaemiát szenvedett szövet sorsát, kimenetelét. Fontos megemlíteni, hogy az ischaemia időtartama jelentősen befolyásolhatja az ischaemiás szövet sorsát a reperfúziós időszakban. Ha ugyanis hosszabb ischaemiás időt választunk, már az ischaemia idején primer irreverzibilis károsodások

alakulhatnak ki, s emiatt a reperfúzió során az ADC normalizálódása már nem várható. Ezt a hipotézist támogatják a Li és mtsai. (1999) által végzett kísérlet eredményei, mely szerint rövid ischaemiás idő esetén megfigyelhető az ADC normalizálódása a reperfúzió alatt, míg hosszabb ischaemiás periódus esetén az ADC javulása elmaradt. A fenti adatok alapján levonható az a következtetés, hogy ha az ischaemia során nem alakul ki irreverzibilis károsodás, akkor a reperfúzió idején teljes vagy részleges javulás jelentkezhet az ADC értékben, mely javulást azonban másodlagos rosszabbodás követhet, az energiametabolizmus másodlagos károsodását jelezve.

A korai reperfúziós fázisban mért kvantitatív T2 érték, mint a szöveti kimenetel prediktora

Mint említettük, az ischaemia végén mért alacsony ADC érték előrejelezheti az ADC javulás elmaradását a reperfúzió idején, azonban sem az ischaemia végén, sem a reperfúzió elején mért ADC nem volt képes differenciálni a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szövet között. Ugyanakkor a quantitatív T2 értékek már röviddel a recirkulációt követően hasznosnak bizonyultak ezen két szöveti kimenetel elkülönítésében, mert míg a korai reperfúzió során a T2 értékek nőttek a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben, addig nem változtak a "helyreállt" szövetet jelző alcsoportban. Bár a T2-súlyozott felvételt általában kevésbé tartják hasznosnak az ischaemia és a reperfúzió korai időszakában, néhány szerző korai változásokat írt le MCAO után aT2 súlyozott felvételeken patkányokban (Mintorovitch és mtsai., 1991; Knight és mtsai., 1994). Valóban, esetünkben sem különült el jól az ischaemiás lézió az 1 órás MCAO végén a T2 súlyozott felvételen, de már ebben a fázisban is enyhén emelkedett T2 értékeket lehetett mérni az ischaemia régiójában a quantitatív T2 felvételeken, mely a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "javulást nem mutató" szövetekben a reperfúzió alatt tovább növekedett (21. ábra és 24.B ábra). Különösen a "másodlagos rosszabbodást mutató" pixelekben érdemel figyelmet a T2 érték korai reperfúziós fázisban megfigyelt emelkedése, ugyanis ebben az alcsoportban már akkor is nőtt a T2 érték, miközben az ADC érték épp normalizálódott (24.A,B ábra). Míg a T2 érték növekedése a szöveti víztartalom növekedését jelzi, addig a szimultán javuló ADC az ischaemia során kialakult citotoxikus ödéma javulására utal. Mindez azt jelenti, hogy a magasabb T2 érték által jelzett megnőtt víztartalom nem írható a sejtduzzadás rovására, hanem a szöveti ozmolalitás növekedésével, esetleg a reperfúzió kezdetén hirtelen növekvő transzmurális nyomásváltozással (Kogure és mtsai., 1981; Betz és mtsai., 1989), illetve a néhány órás késéssel megjelenő vazogén ödémával magyarázható.

Az ADC és az energiametabolizmus másodlagos rosszabbodásának lehetséges magyarázata

A másodlagos ADC csökkenésnek és a korábban már leírt másodlagos energiametabolizmus károsodásnak (Hata és mtsai., 2000; Folbergrova és mtsai., 1995) a háttere máig nem tisztázott. A jelenség egyik legvalószínűbb magyarázata a mitokondriális diszfunkció. Két órás MCAO-t követő 2 órás reperfúzió során többen is leírták a sejt energiaállapotának és a mitokondrium funkciójának a részleges javulását (Folbergrova és mtsai., 1995; Kuroda és mtsai., 1996; Canevari és mtsai., 1997). Ezek a változások szoros időbeli egyezést mutattak az általunk megfigyelt ADC érték javulásával a reperfúzió korai szakaszában. Bár nincs direkt bizonyítékunk rá, de az energiametabolizmus másodlagos károsodását illetően a későbbi munkánkban (Oláh és mtsai., 2001) megfigyelt ATP és ADC hasonló időbeli változása is a reperfúziós fázisban jelentkező mitokondriális diszfunkció meglétét valószínűsítették. Ugyanakkor, a reperfúziót követően hosszú időn át fennálló gátolt agyi protein szintézis (Cooper és mtsai., 1977; Abe és mtsai., 1988; Hata és mtsai., 2000) is kulcsszerepet játszhat a késői, másodlagos neuronális károsodásban, mivel megakadályozza a sejt túléléséhez szükséges fehérjék termelését. A protein szintézis késői javulásának, vagy a javulás elmaradásának az oki szerepét támogatják azok a megfigyelések, melyek szerint az energiastátusz másodlagos károsodása az MCAO időtartamától függően először az ischaemiát szenvedett régió centrumában kezdődik, majd a periféria felé terjed mindaddig, míg eléri a károsodott protein szintézis határát (Mies és mtsai., 2001). Bár az apoptózist, mint a másodlagos szöveti károsodás okát sem tudtuk elvetni (Charriaut-Marlangue és mtsai., 1995; Li és mtsai., 1995), a kísérletünkben megfigyelt másodlagos ADC csökkenés ezt a folyamatot, mint fő mechanizmust, nem támogatta. Az ADC másodlagos csökkenése ugyanis sejtduzzadást jelzett, nem pedig a sejt zsugorodását, mely az apoptózis egyik alapvető jellegzetessége (Bortner és Cidlowski, 1998). Emellett az apoptózis során az apoptótikus sejtek elszórtan jelennek meg, melynek a makroszkópikusan is jól megfigyelhető kiterjedésű ADC változás ellentmondott. Az ischaemiát követő reperfúzió során egy esetleges hipoperfúzió is magyarázhatta volna a másodlagos szöveti károsodást (Levy és mtsai., 1979), azonban kísérletünkben végig követtük a perfúziós szignál intenzitást, s abban az időben, amikor a másodlagos ADC csökkenés jelentkezett, a perfúziós szint nemhogy alacsonyabb, hanem épp magasabb volt a kontroll, kiindulási értéknél. Megjegyzendő, hogy bár a reperfúzió későbbi szakaszában a perfúziós szignál intenzitás valóban a kiindulási preischaemiás érték alá csökkent, ez a változás nem volt szignifikáns. Hozzánk hasonlóan, sem Li és mtsai. (1998, 2000a), sem van Lookeren Campagne és mtsai. (1999) nem tudtak szignifikáns, késői hipoperfúziót kimutatni a másodlagos ADC csökkenés hátterében.

Terápiás időablak a reperfúziós fázisban?

Az a megfigyelés, miszerint rövid időtartamú ischaemia után az energiametabolizmus a reperfúzió korai szakaszában javul, reménykeltő lehet a sejtek túlélése szempontjából. Ugyanakkor az energiametabolizmusnak a reperfúzió későbbi szakaszában jelentkező másodlagos és egyben irreverzibilis károsodása egyértelműen kedvezőtlenül befolyásolja az átmeneti ischaemiát szenvedett szövet sorsát. Ha ez a másodlagos károsodás megelőzhető lenne, jelentősen lehetne javítani az experimentális stroke kimenetelét. Ezt felismerve, többen tettek kísérletet arra, hogy az energiatermelés másodlagos károsodását megelőzzék. Az ezt célzó kísérletek közül tranziens cerebrális ischaemiában a legtöbb kedvező kimenetelű gyógyszeres próbálkozás a recirkuláció utáni első 3 órában történt szabad-gyököket gátló szerrel, vagy a mitokondrium belső membránjának permeabilitás fokozódását megelőző ciklosporin analóg alkalmazásával (Folbergrova és mtsai., 1995; Matsumoto és mtsai., 1999). Ez azt jelenti, hogy nemcsak az ischaemiás fázisban, de a reperfúziós időszakban is lehet egy terápiás időablak, melyen belül még észszerű a reperfúziós károsodás kezelésével próbálkozni. Adataink azt mutatták, hogy az energiametabolizmus másodlagos károsodását jelző másodlagos ADC csökkenés a reperfúzió után 2-3 órával kezdődött, tehát a reperfúzió utáni 3 órás időablak észszerűnek tűnhet. Amennyiben az energiametabolizmus másodlagos károsodása a trombolízis, vagy mechanikus trombektómia után is fennáll, ennek megelőzésével és kezelésével a rekanalizációs terápia kimenetele javítható lenne.

Egyelőre azonban az sem ismert, hogy mikor dől el annak az átmeneti ischaemiát szenvedett szövetnek a sorsa, melyben a reperfúzió során az energiametabolizmus rendeződik. Ha azt már az ischaemiás károsodás determinálja, akkor nem lehet beleszólásunk a folyamatba. Azonban, ha az energiametabolizmus másodlagos rosszabbodása a reperfúziós károsodás része, vagyis azt a reperfúzió indukálja, akkor egy, még a recirkuláció indukciója előtt alkalmazott terápiával számottevően lehetne javítani az ischaemiás szövet kimenetelét.

Az ATP hiány és ADC csökkenés közötti korreláció. - A DWI lézió és a csökkent ADC érték értékelése fokális cerebrális ischaemiában

Az ADC korai csökkenése cerebrális ischaemia során, s ezáltal az ischaemiás károsodás gyors kimutatásának a lehetősége a diffúzió-súlyozott MR vizsgálatok gyors elterjedéséhez vezettek mind a stroke kutatás terén, mind a klinikai gyakorlatban. Bár a víz diffúzió változása és az ADC változása közötti kapcsolat részleteiben máig nem ismert, az általánosan elfogadott, hogy cerebrális ischaemiában az ADC csökkenés hátterében az extraés intracelluláris víztartalom megváltozása áll az intracelluláris víz javára, melyet az energiametabolizmus károsodása következtében kialakuló anoxiás membrán-depolarizáció okoz (Moseley és mtsai., 1990). Ugyanakkor, mivel fokozatos, de szignifikáns ADC csökkenés már az anoxiás membrán depolarizáció kialakulása előtt is kimutatható (Harris és mtsai., 2000) és megtartott ATP szint mellett is leírták (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995), egyéb mechanizmusnak, mint az acidózisnak, vagy a membrán permeabilitás enyhébb változásának is szerepe lehet az ADC csökkenésében. Hoehn-Berlage és mtsai. (1995a) az ADC-t a metabolikus változásokkal (ATP, pH) összehasonlító tanulmányukban igazolták, hogy 2 órás MCAO során a legalább 23%-os ADC csökkenés jól korrelált a szöveti ATP deplécióval, míg a szöveti acidózis legalább 10% ADC csökkenés mellett jelentkezett (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). Mivel a penumbra meghatározás egyik módszere a szöveti acidózist mutató régió és az ATP hiányos terület különbségén alapszik, a relatív ADC meghatározás lehetőséget adhat az energiametabolizmus károsodásával járó ischaemiás mag és a normális energiametabolizmussal, de szöveti acidózissal jellemezhető penumbra differenciálására permanens agyi ischaemiában.

Az ATP tartalom és ADC érték párhuzamos alakulása tranziens fokális cerebrális ischaemiában

Az 1990-es évek végén egyre több állatkísérletes tanulmány jelent meg, melyek vagy az ADC érték (Li és mtsai., 2000a; Oláh és mtsai., 2000; van Lookeren Campagne és mtsai., 1999), vagy az ATP tartalom (Folbergrova és mtsai., 1995; Hata és mtsai., 2000) részleges, vagy teljes normalizálódását igazolták rövid ideig tartó cerebrális ischaemiát követő reperfúziós fázis korai szakaszában. A fenti tanulmányokban az ADC, vagy ATP korai reperfúziós szakban leírt normalizálódását azonban a recirkuláció későbbi fázisában másodlagos ADC csökkenés, vagy az energiametabolizmus másodlagos károsodása követte. Annak ellenére, hogy az ADC és az ATP tartalom változása hasonló irányú és időbeli lefolyású volt, csak kevés tanulmány vetette fel, hogy az ADC változás az energiametabolizmus változását tükrözheti permanens (Back és mtsai., 1994; Hoehn-Berlage és mtsai., 1995; Moseley és mtsai., 1990) vagy tranziens (Fischer és mtsai., 1995; Hossmann és mtsai., 1994) cerebrális ischaemiában. Míg azonban az ADC és az energiametabolizmust jelző ATP szint közötti kapcsolatot permanens MCAO során tanulmányozták (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995), addig hasonló vizsgálat átmeneti agyi ischaemiában a vizsgálatunk előtt nem történt. Célunk annak a megválaszolása volt, hogy vajon az ADC érték javulása/normalizálódása a reperfúzió korai fázisában, majd az ADC másodlagos csökkenése a recirkuláció későbbi szakaszában az ATP szint hasonló változását tükrözie patkányokban. Ebből a célból 3 csoportot képeztünk: az első csoportban a patkányokban a bal oldali MCA-t 1 órára elzártuk és nem történt reperfúzió, a második csoportban az 1 órás MCAO-t 1 órás reperfúzió, míg a harmadik csoportban az egyórás MCAO-t 10 órás reperfúzió követte. A vizsgálatok alatt mind az MCA okklúziójára, mind a reperfúzióra az MR-ben került sor anélkül, hogy az állatok pozícióját megváltoztattuk volna (remote, vagy távoli okklúziós modell). A vizsgálatok végén az állatokat lefagyasztottuk. A megfigyelési időszak minden órájában perfúzió- és diffúzió-súlyozott felvételeket készítettünk és ADC térképet számítottunk. A kísérlet végén, közvetlenül az állat folyékony nitrogénben történt lefagyasztása előtt ADC térképet készítettünk, s azt a későbbiekben ATP és pH térképekkel hasonlítottuk össze. Az összehasonlítás során az energiametabolizmus károsodását (ATP depléció) és a szöveti acidózist jelző ADC küszöbértékeket mindhárom csoportban meghatároztuk.

Az ATP depléciót és a szöveti acidózist jelző relatív ADC küszöbértékek

Eredményeink megerősítették a korábbi kísérletünkben igazolt 1 órás tranziens cerebrális ischaemia reperfúziós időszakában jelentkező ADC javulást a korai, majd a másodlagos ADC csökkenést a késői recirkulációs fázisban. Ezen túl, nemcsak az ADC, hanem a szöveti acidózis és az ATP hiány alapján mért féltekei lézió térfogata is csökkent 1 órával a reperfúzió után, majd szignifikánsan nőtt a recirkuláció után 10 órával. **Az energiametabolizmus károsodását (ATP depléciót) jelző relatív ADC érték mind az 1 órás MCAO végén, mind a reperfúzió 1. és 10. órájában a kontroll ADC kb. 77%-a volt, mely függetlenül a kísérlet fázisától egy, az ATP hiányt jól jelző stabil ADC küszöbértékre utalt**. Ezzel szemben, a szöveti acidózist jelző relatív ADC érték az 1 órás MCAO végén a kontroll érték 86%-a volt, majd ez az érték a reperfúzió 1. órájának a végére megközelítette, s a 10. óra végére elérte az energiametabolizmus károsodását jelző relatív ADC értéket.

Korábbi eredményekkel összhangban (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995) az acidózis alapján számolt lézió térfogata szignifikánsan nagyobb volt az 1 órás MCAO végén, mint az ATP depléció alapján számított lézió térfogata, mely azt is jelentette, hogy az acidózist jelző relatív ADC küszöb magasabb volt, mint az ATP hiányt jelző küszöbérték. Ezek az adatok arra utaltak, hogy abban a régióban, ahol az energiametabolizmus károsodott, az ADC jelentősen csökkent, ami az MCAO során kialakuló anoxiás depolarizációval magyarázható, melynek során az intracelluláris Na⁺ koncentráció nő, s ennek megfelelően víz áramlik az extracelluláris térből az intracelluláris kompartmentbe (citotoxikus ödéma). Ugyanakkor, az a megfigyelés, miszerint kevésbé kifejezett, de mégis szignifikáns ADC csökkenés jelentkezett a szöveti acidózis azon régiójában is, ahol még nem volt ATP depléció azt jelezte, hogy az ischaemia során nemcsak az energiametabolizmus károsodása, azaz az ATP hiány miatt kialakult anoxiás depolarizáció (Harris és mtsai., 2000), hanem egyéb mechanizmus is szerepet játszott az ADC csökkenésében. Az agyi vérátáramlás olyan mérvű csökkenése, mely még nem károsítja az energiametabolizmust, de már elég alacsony ahhoz, hogy szöveti hipoxiát okozzon, a sejtekben anaerob glikolízist indít el (Hossmann, 1994; Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). Mindez a laktát intracelluláris akkumulációjával jár, mely ozmotikus tulajdonsága révén enyhe sejtduzzadáshoz vezethet anoxiás depolarizáció nélkül is. Emellett az acidózis aktiválhatja a Na⁺/H⁺ antiport rendszert, mely így további intracelluláris Na⁺ koncentráció emelkedést és következményes sejtduzzadást okozhat (Harris és mtsai., 2000; Kempski és mtsai., 1998). Mint ahogy azt korábban leírták (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995), permanens ischaemiában az ATP depléciót és a szöveti acidózist jelző különböző relatív ADC küszöbértékek alapján kísérletes körülmények között lehetőség nyílik MR vizsgálattal az ischaemiás mag (ATP depléció területe) és a penumbra (szöveti acidózis és ATP depléció területének a különbsége) elkülönítésére.

ADC érték, mint az energiametabolizmus markere

Vizsgálatunk legfőbb eredménye az volt, hogy az energiametabolizmust jelző relatív ADC küszöbérték kb. 77% volt nemcsak az 1 órás MCAO alatt, de a reperfúzió különböző fázisaiban is, mely arra engedett következtetni, hogy az ADC csökkenés szorosan összefügg a sejt energiastátuszával nemcsak az ischaemia, hanem a reperfúzió időszakában is.

Azt a hipotézist alkalmazva, mely szerint az ADC változás az extra- és intracelluláris térfogat változásán alapul, az ATP szint és az ADC érték párhuzamos javulása a recirkuláció után 1 órával megmagyarázható a sejt energiastátuszának a javulásával. Az ATP szint javulása következtében ugyanis a Na⁺/K⁺ ATP-áz aktiválódhat, s eltávolíthatja az ozmotikusan aktív Na⁺-ot, s vele együtt a vizet is a sejtből, aminek következtében az intracelluláris térfogat csökken, az extracelluláris térfogat nő, vagyis az intra- és extracelluláris térfogat aránya rendeződik. Meg kell azonban jegyezni, hogy az ADC érték javulása az ischaemiát követő reperfűzió során önmagában nem tekinthető a kedvező kimenetel indikátorának két okból sem: egyrészt abban a területben ahol az ischaemia utáni recirkuláció korai fázisában az ADC rendeződött, másodlagos ADC rosszabbodás és irreverzibilis szöveti károsodás következhet be a reperfűzió későbbi szakaszában, másrészt az ADC úgynevezett "pszeudonormalizációja" alakulhat ki a szöveti nekrózis krónikus szakában, amikor az ADC érték a sejtmembrán degradációja és az intracelluláris tér megszűnése miatt, nem pedig az energiastátusz javulása miatt normalizálódik (Knight és mtsai., 1994).

Az ADC másodlagos rosszabbodása az energiametabolizmus másodlagos károsodása alapján szintén magyarázható, mivel az ATP depléció miatt a Na⁺-K⁺ ATP-áz nem lesz képes a sejtbe áramló Na⁺-ot eltávolítani, mely az intracelluláris Na⁺ felszaporodásához és következményes ssejtduzzadáshoz vezet. Az energiametabolizmus károsodása mellett az acidózis is hozzájárulhat a sejtduzzadáshoz, mivel a pH csökkenése aktiválja a Na⁺/H⁺ antiport rendszert, mely tovább fokozza az intracelluláris Na⁺ koncentrációt, s ezáltal az intracelluláris térfogatot is.

A szöveti acidózis alakulása a reperfúzió során

Szemben az 1 órás MCAO végén kapott eredményekkel, a reperfúzió során mind 1 órával, mind 10 órával a recirkuláció után a szöveti acidózis és az ATP depléció által

meghatározott lézió térfogata nagyon hasonló volt. Ez azt jelenti, hogy az acidózis megszűnik, ha a véráramlás és az energiametabolizmus helyreáll, de újra megjelenik, ha az ATP tartalom másodlagosan csökken a reperfúziós fázisban. Az agyi véráramlás helyreállítása az oxidatív metabolizmus rendeződését eredményezi, s így az anaerob glikolízis és a laktát képződés megszűnik. Az energiametabolizmus rendeződése szintén hozzájárul az acidózis megszűnéséhez, mivel az ATP képződéshez a mitokondriumok protont (H⁺⁾ használnak fel (Siesjö, 1985). Eredményeink Saito és mtsai. (1992) adataival összhangban azt igazolták, hogy az acidózis megszűnése az ATP tartalom javulásától, normalizálódásától függ. Mások szintén kimutatták az acidózis és az ATP szint rendeződését a korai reperfúziós szakban (Allen és mtsai., 1988; Behar és mtsai., 1989; Siesjö és mtsai., 1985), melynek üteme az ischaemiás időtartamtól függött (Nishijima és mtsai., 1989).

Az ADC-ATP korreláció korlátai

Kísérleti adataink azt jelezték, hogy a kb. 77%-os relatív ADC küszöbérték jó közelítést ad az energiametabolizmus károsodására nemcsak a permanens, de a tranziens MCAO modell alkalmazásakor is. Ugyanakkor ez a küszöb változhat a recirkuláció kezdeti szakaszában, amikor feltehetően nagyon gyors változások történnek a víz és ion homeostasisban, az ATP szintézisben, s az intracelluláris Na⁺ koncentrációban. Ezek a folyamatok azonban gyorsan, a cerebrális ischaemia időtartamától függően a reperfúzió első 15-45 percében lezajlanak (Allen és mtsai., 1988; Nishijima és mtsai., 1989). Az ATP tartalom és az ADC érték változás mértéke (és iránya) eltérő lehet az átmeneti, vagy permanens cerebrális ischaemia krónikus fázisában is, amikor az ADC úgynevezett pszeudonormalizációja történik (Helpern és mtsai., 1993; Knight és mtsai., 1994; Li és mtsai., 2000a; Schlaug és mtsai., 1997). Ez az elnevezés az ADC napokkal az ischaemia utáni látszólagos normalizálódására utal anélkül, hogy a T2 érték rendeződne. Ezek a változások a nekrózis kezdetét és a sejtmembrán degradációját jelzik. Vizsgálatunkban a megfigyelési időpontok (1 és 10 órával a recirkuláció után) túl voltak a recirkuláció nagyon kezdeti, kritikus időszakán és jóval korábban megtörténtek mint az ADC pszeudonormalizáció várható ideje.

Tanulmányunk fő üzenete, hogy a fenti korlátozások figyelembevételével a relatív ADC térkép jól használható az energiametabolizmus változásainak az időbeli követésére a reverzibilis cerebrális fokális ischaemia akut fázisának különböző időszakaiban.

Összefoglalás, következtetés

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy az 1 órás MCAO-t követő 10 órás reperfúzió során a reperfúzió első két órájában az ADC érték jelentősen javult, majd a reperfúzió későbbi időszakában ismét csökkent. Az ischaemia végén mért alacsony relatív ADC érték alapján megbecsülhető az irreverzibilis ischaemiás károsodást szenvedett terület, ugyanakkor a másodlagos reperfúziós károsodás megítélésére a jelenleg elérhető MR szekvenciák használatával csak a korai reperfúzió idején van leghamarabb lehetőség a relatív T2 érték emelkedése alapján. Eredményeink azt jelzik, hogy az ADC érték javulása az ischaemiát követő reperfúzió során önmagában nem tekinthető a kedvező kimenetel indikátorának, mivel abban a területben ahol az ischaemia utáni recirkuláció korai fázisában az ADC rendeződött, másodlagos ADC rosszabbodás és irreverzibilis szöveti károsodás következhet be a reperfúzió későbbi szakaszában. Megállípítottuk továbbá , hogy az energiametabolizmus károsodását (ATP depléciót) jelző relatív ADC érték mind az 1 órás MCAO végén, mind a reperfúzió 1. és 10. órájában a kontroll ADC kb. 77%-a volt.

Mivel a kísérletünkben használt MR szekvenciák a klinikai vizsgálatok során is elérhetők, eredményeink jól használhatók az irreverzibilis károsodás területének, s ezáltal a prognózisnak a becslésére. Adataink alapján érdemes lenne a másodlagos károsodás meglétét humán tanulmányokban részletesebben vizsgálni, s ennek igazolása esetén a másodlagos károsodás megelőzésére klinikai vizsgálatokat tervezni. Bár relatív ADC és T2 értékek az ischaemia előtti értékekhez viszonyítva humán vizsgálatokban nem számolhatók, több követhető példa van az ellenoldali félteke identikus területének, mint kontroll szövetnek a használatára (Oppenheim és mtsai., 2001; Petkova és mtsai., 2010), mellyel már a relatív értékek meghatározhatóak.

5.1.4. Átmeneti agyi ischaemia hatása az agyi energiametabolizmusra és NAD szintre egerekben

A PARP hipotézis

Az energiametabolizmus másodlagos károsodásának hátterében számos mechanizmus lehetőségét felvetették, mint pl. a szabadgyökök okozta mitokondriális diszfunkciót, vagy a kálcium indukálta oxidatív foszforiláció károsodását (Kristian és Siesjö, 1998). Ezen mechanizmusok mellett komolyan felmerült annak a lehetősége is, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) túlzott aktivációja lenne felelős az energiametabolizmus másodlagos rosszabbodásáért (Endres és mtsai., 1997). A PARP minden olyan esetben aktiválódik, mely a DNS lánc töréséhez, károsodásához vezet, s a PARP túlzott aktivációja hozzájárulhat a további sejtkárosodáshoz számos patológiás állapotban, mint pl. diabeteszben, shockban, ischaemiában (Pieper és mtsai., 1999). A PARP hipotézis szerint a PARP túlzott aktivációja a NAD felhasználásához vezet, mely a PARP szubsztrátja és szükséges a poli(ADP-ribóz) szintéziséhez. Ugyanakkor az ATP termeléshez is szükség van NAD-ra, mely egy fontos koenzim az energiatermelés folyamatában, s melynek PARP általi felhasználása elvileg valóban vezethetne ATP deplécióhoz és így az energiametabolizmus zavarához. Amennyiben ez a hipotézis helytálló, akkor a NAD tartalomnak jelentősen csökkennie kellene még az ATP depléció előtt. Tanulmányunk előtt azonban még senki sem vizsgálta szimultán az ATP szintet és az agyszövet energiastátuszát valamint a NAD tartalmat tranziens fokális cerebrális ischaemia során. Célunk az ATP és NAD tartalom változás meghatározása volt átmeneti agyi fokális ischaemiában különböző reperfúziós idők mellett.

A PARP hipotézis cáfolata – az ATP depléciót nem előzte meg a NAD tartalom csökkenése

Eredményeink átmeneti agyi fokális ischaemiában nem erősítették meg a PARP hipotézist, mivel a NAD tartalom csökkenése nem előzte meg és mértékében sem haladta meg az ATP szint csökkenését. Tanulmányunkban 2 minta kivételével, az 1 órás MCAO-t követő különböző reperfúziós időszakban az ATP depléció mértéke nagyobb volt, mint a NAD depléció, s az adenilát energiatöltöttséget vizsgálva nem tapasztaltunk eltérést az energiatermelés és energiafelhasználás között sem, sőt, az energiatöltöttség a reperfúzió 6. órájáig normális maradt. Hozzánk hasonlóan, 1 órás átmeneti globális cerebrális ischaemiát követően macskákban mások sem tudták kimutatni, hogy a NAD szint csökkenés megelőzné az ATP depléciót (Kleihues és mtsai., 1974). Sőt, Kleihues és mtsai. (1974) az 1 órás globális agyi ischaemia utáni 6.5 órás reperfúziós időszakban az ATP szint jelentős csökkenését észlelték, annak ellenére, hogy a NAD tartalom számottevően nem változott. Ezek az eredmények tehát ellentmondanak annak a feltételezésnek, hogy a PARP aktiváció következtében bekövetkező NAD szint csökkenés átmeneti agyi ischaemiában kulcsszerepet játszana az energiametabolizmus másodlagos rosszabbodásában. Megfigyeléseinket alátámasztották azok a kísérletek, melyek igazolták, hogy a korábban felvetett PARP hipotézissel kapcsolatos tanulmányokban a NAD depléciót nem feltétlenül a PARP túlzott aktivációja eredményezte (Kupper és mtsai., 1999), illetve szimultán NAD és ATP depléció esetén a két változás között nem volt egyértelmű ok-okozati kapcsolat (Andreoli, 1989)

Összefoglalás, következtetés

Eredményeink átmeneti agyi fokális ischaemiában nem erősítették meg a PARP hipotézist, mivel a NAD tartalom csökkenése nem előzte meg és mértékében sem haladta meg az ATP szint csökkenését.

A PARP átvonal gátlása tranziens fokális agyi ischaemiában nagy valószínűséggel nem mérsékli a reperfúziós károsodást, vizsgálatokban történő kipróbálását nem tartjuk célszerűnek.

5.1.5. Állatkísérletes megfigyeléseink értékelése a klinikai eredmények tükrében

5.1.5.1. A klinikai stroke vizsgálatok értékelése kísérletes MR vizsgálataink eredménye alapján

A szigorú kritériumok alapján elvégezhető trombolízis és mechanikus trombektómia térhódításával számos tisztázandó kérdés merült fel az akut stroke betegek kezelését illetően. - Mivel a trombolízis és trombektómia a stroke tüneteinek kialakulásától számított meghatározott időablakon belül kezdhető, egyre fontosabbá vált a stroke idejének és a reverzibilisen illetve irreverzibilisen károsodott ischaemiás területnek a becslése, melyben az MR vizsgálat komoly szerepet kapott.

- Alapvető volt annak a tisztázása, hogy az akut ischaemia szakában megbecsülhető-e az MR paraméterek alapján a stroke klinikai kimenetele permanens, illetve tranziens cerebrális ischaemiában.

 Vita tárgyát képezte, hogy a DWI felvételen látható eltérés irreverzibilis károsodást jelez-e, s ha nem, akkor az állatkísérletekben a korai reperfúzió szakában készített DWI felvételeken és az abból származtatott ADC képeken megfigyelhető javulást követi-e másodlagos rosszabbodás.

- Fontos továbbá annak a tisztázása, hogy a tranziens cerebrális ischaemia modellek eredményei mennyire alkalmazhatók a klinikai stroke kutatásban.

A következő fejezetekben a fenti kérdésekre választ adó tanulmányokat foglaljuk össze saját eredményeink tükrében.

A stroke kezdete és az MR vizsgálat között eltelt idő becslése permanens fokális agyi ischaemiában

A rekanalizációs terápiák indikációjában jelentős tényező a stroke tünetek kialakulásától a kezelés megkezdéséig eltelt idő. Természetesen a stroke fennállásának ideje könnyen kiszámítható, ha a beteg, vagy a környezetében lévők be tudnak számolni a tünetek kialakulásának az időpontjáról, azonban az ébredési stroke-ok esetén erre nincs lehetőség, mint ahogy egy szenzo-motoros afáziás beteg esetében sem lehet a stroke időtartamát meghatározni, ha nem volt szem-, vagy fültanúja az eseménynek. Emiatt ezekben az esetekben elsősorban a biztonságosságot szem előtt tartva a stroke időtartamát úgy becsüljük meg, hogy a tünetek kezdetének azt az időpontot számítjuk, amikor a beteg még utoljára jól volt. Ezzel azonban sajnos a betegek kb. 1/4-ét kizárjuk a rekanalizációs terápiából, noha elképzelhető, hogy különösebb veszély nélkül kezelhetők lennének, ha pontosan ismernénk a tünetek kialakulásának az idejét. A fentiekre tekintettel merült fel az a kérdés, hogy képalkotók segítségével meg lehet-e becsülni a stroke kialakulásának az idejét (Petkova és mtsai., 2010), esélyt adva ezzel az alvásból ébredt betegeknek is a trombolízis kezelésre, vagy a mechanikus trombektomiára.

Ismert időtartamú, ischaemiás stroke betegeket 1.5 T MR-rel tanulmányozva Petkova és mtsai. (2010) azt vizsgálták, hogy a FLAIR (fluid attenuated inversion recovery), a DWI, vagy az ADC értékek lehetnek hasznosak a 3 órán belüli és a 3 órán túli ischaemiás stroke-ok elkülönítésében. A fenti felvételeken a lézióban és a lézióval azonos nagyságú és lokalizációjú ellenoldali területben mért értékek hányadosából egy arányt számoltak, s az így meghatározott relatív értékeket használták az analízishez. Azt találták, hogy a FLAIR szignál intenzitás hányados volt a legmegbízhatóbb paraméter annak elkülönítésében, hogy a felvétel a stroke tünetek kialakulásához képest 3 órán belül, vagy 3 órán túl történt, míg a DWI és az ADC kevésbé volt használható a 3 órán belüli stroke-ok elkülönítésében. Ez nem meglepő, mivel a T2 relaxációs idő az ischaemiás stroke elején a szöveti víztartalommal párhuzamosan és lineárisan nő, míg az ADC az ischaemia utáni fél órában meredeken csökken, melyet további, de jóval lassúbb ADC csökkenés követ (Thulborn és mtsai., 1999; Jones és mtsai., 2006). A fentiek alapján érthető, hogy az ischaemia első óráiban megfigyelt T2 relaxációs idő lineáris változása sokkal megbízhatóbb a stroke időtartamának a becslése terén, mint a nem-lineáris ADC változás (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995; Hossmann és Schuier, 1980; Sclaug és mtsai., 1997; Schuier és Hossmann, 1980; Siemonsen és mtsai., 2009; Watanabe és mtsai., 1977). Mivel a FLAIR módszer egy T2 súlvozott képalkotási technikát kombinál a liquor-jel elnyomásával, a FLAIR szignál változása is arányos az ischaemia időtartamával, sőt érzékenyebb az ischaemiára, mint az eredeti T2 súlyozott felvétel (Siemonsen és mtsai., 2009; Thomalla és mtsai., 2009; Petkova és mtsai., 2010). Így tehát a DWI felvételen lévő szignálváltozás a FLAIR szignál lényeges változása nélkül hiperakut, 3 órán belüli stroke kezdetre utal, míg a DWI pozitivitás és a FLAIR szignál növekedése 3 órán túli stroke kezdetet jelez. Mivel az MR mintegy óraként használható a stroke időtartam becslésére, ismeretlen ideje fennálló akut stroke-ban is alkalmas lehet a trombolízisre alkalmas betegek kiválasztásában, növelve ezzel a hatékony kezelés esélyét.

A stroke kimenetel és a végső infarktus méretének becslése a permanens ischaemia akut szakában mért MR paraméterek alapján

Oppenheim és mtsai. (2001) ipszilaterális/kontralaterális ADC hányadost használva azt találták, hogy a permanens ischaemia első 6 órájában a legalább kb. 10% relatív ADC csökkenés (vagyis a 90%-os relatív ADC érték) használható a stroke után 2-4 nappal készült MR alapján definiált végső infarktus méretének a meghatározására. Szembetűnő, hogy ez az érték egyértelműen magasabb, mint az a 77%-os relatív ADC küszöb, amit mi 1 órás, vagy Hoehn-Berlage és mtsai. 2 órás MCAO végén az ATP deplécióval jellemzett ischaemiás magban találtunk (Oláh és mtsai., 2001; Hoehn-Berlage és mtsai., 1995). A diskrepancia oka a különböző ischaemiás időtartamokban keresendő. Míg Oppenheim és mtsai. a stroke tünettől számított 6 órán belül készített ADC térkép alapján becsülték a 2-4 nappal későbbi MR vizsgálattal meghatározott végső infarktus méretét, addig az állatkísérletben a relatív ADC térkép elkészülte után a kísérletet befejeztük, vagyis az ATP depléció alapján definiált ischaemiás mag területe kb. az ADC térkép idején fennálló viszonyokat tükrözte. Márpedig 2-4 nap után az akut szakban meglévő penumbra reperfúzió hiányában bevonódik az ischaemiás magba. Ez azt jelenti, hogy ha permanens ischaemiában a napokkal későbbi infarktus méretét akarjuk megbecsülni az akut szakban mért relatív ADC alapján, akkor nemcsak az akut szakban meghatározott ischaemiás mag, de a penumbra méretét is figyelembe kell venni, hisz ez recirkuláció híján idővel infarceálódik. Ha ezt a gondolatmenetet vesszük alapul, akkor a 90% körüli relatív ADC küszöb már nagyon közel áll az állatkísérletben meghatározott penumbra küszöbhöz. Hoehn-Berlage és mtsai. ugyanis azt találták, hogy 2 órás MCAO esetén a penumbra a 77-90% közötti relatív ADC, míg az ischaemiás mag a 77% alatti relatív ADC alapján számítható. Ezt figyelembe véve az akut szakban az ischaemiás mag + penumbra együtt a 90% alatti relatív ADC küszöb alapján becsülhető, mely napokkal később, a penumbra ischaemiás magba vonódásával már a végső infarktus méretének fog megfelelni. Mi is hasonló küszöbértékeket találtunk 1 órás MCAO során: esetünkben az ischaemiás magot jelző relatív ADC küszöb 76%, a penumbrát jelző küszöbérték pedig 86% volt. Oppenheim és mtsai. tanulmánya (2001) az eredményeken túl felhívja a figyelmet az ellenoldali, ischaemiát nem szenvedett féltekében mért ADC-hez viszonyított relatív ADC hasznosságára és használhatóságára.

A DWI lézió és az ADC csökkenés értékelése és értelmezése a szöveti kimenetel szempontjából permanens ischaemiában

Az elmúlt években igazolódott, hogy a DWI felvételeken látott léziók egy része visszafejlődhet, vagyis az akut DWI léziók nem feltétlenül jeleznek irreverzibilis károsodást, különösen nem, ha megfelelő időn belül sikeres reperfúzió történik az adott területben. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a DWI felvételen látott lézió nemcsak az irreverzibilisen károsodott területet, de a penumbra egy részét is magában foglalja. Emiatt kétségesnek tartják, hogy a DWI felvétel és az egyszerű ADC térkép alapján el lehetne különíteni az irreverzibilis és reverzibilis ischaemiás károsodást (Tortora és mtsai., 2010). Ezek a megfigyelések összhangban állnak eredményeinkkel, miszerint az ischaemia idején az ADC érték nemcsak abban a területben csökkent, ahol az energiametabolizmus károsodott (ATP depléció), de abban a régióban is, ahol acidózis alakult ki megtartott ATP szint mellett. Ez azt jelenti, hogy nemcsak az ischaemiás magban, de a penumbrában is van DWI eltérés és ADC csökkenés (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995; Oláh és mtsai., 2001). Kvantitatív ADC térkép készítése és relatív ADC küszöbértékek alapján történő meghatározás már pontosabb becslést eredményezhetne a penumbra (77% fölötti, de 86-90% alatti relatív ADC) és az ischaemiás mag (77% alatti relatív ADC) differenciálására permanens ischaemia esetén (Hoehn-Berlage és mtsai., 1995; Oláh és mtsai., 2001). Meg kell azonban említeni, hogy reperfúzió hiányában a penumbra területe 6-12 óra alatt bevonódik az ischaemiás mag területébe, tehát a stroke kimenetel szempontjából permanens ischaemia esetén az akut szakban meghatározott penumbra és ischaemiás mag együttese (90% alatti relatív ADC) közelíti meg leginkább a végső infarktus térfogatát, mint ahogy ezt Oppenheim és mtsai. (2001) adatai is sugallták.

Az ischaemia idején megfigyelt ADC csökkenés értelmezése a szöveti kimenetel szempontjából reverzibilis ischaemiában

A jelen tudásunk szerint reverzibilis ischaemiában, vagyis sikeres rekanalizációs terápia esetén nagyon nehéz, szinte lehetetlen az ischaemia időszakában készített DWI és ADC képekből megbecsülni a végső infarktus térfogatát. Eredményeink (Oláh és mtsai., 2000) azt jelezték, hogy az ischaemia idején az ADC csökkenéssel jellemezhető pixelekben az ADC a recirkulációt követően vagy alacsony maradt (javulást nem mutató, irreverzibilisen károsodott szövet), vagy javult. Annak a szövetnek, melyben az ADC a reperfúzió korai fázisában normalizálódott, kétféle sorsa lehet a reperfúzió későbbi szakaszában: vagy másodlagosan rosszabbodik az energiametabolizmus, vagyis infarktus alakul ki, vagy tartósan fennmarad a visszaállt energiametabolizmus, azaz a szövet túlél (50. ábra). Vizsgálataink igazolták, hogy az ischaemia időszakában tapasztalt súlyos ADC csökkenés alapján megbecsülhető az a terület, mely biztosan irreverzibilis károsodást szenved, vagyis nem normalizálódik a szöveti energiametabolizmus a recirkuláció után sem. Ezzel szemben, az ischaemia során mért ADC alapján nem jósolható meg, hogy mi lesz a recirkuláció korai szakaszában a normalizálódott ADC-vel jellemezhető pixelek sorsa a recirkuláció későbbi szakaszában. Ennek az az oka, hogy ha javul is a korai fázisban az energiametabolizmus, az nem feltétlenül jelenti azt, hogy a szövet megmenekült az infarktustól, mert a reperfúzió későbbi szakaszában másodlagosan rosszabbodhat az energiastátusz (21., 23. és 50. ábra) Kísérletünkben az ischaemiás szakban károsodást szenvedett, de a korai reperfúzió során helyreállt ADC-vel jellemezhető pixelek közül a másodlagos károsodást mutató pixelek meghatározására a jelenleg használt MR paraméterek alkalmazásával legkorábban a korai reperfúzió során nyílt mód a kvantitatív T2 térkép által. Abban a szövetben ugyanis, mely a reperfúzió után túlélt, normális maradt a T2 érték, míg a másodlagos károsodást mutató szövetben már a korai reperfúziós fázisnak abban a szakában emelkedett a T2 érték, amikor még a normalizálódott ADC nem jelzett másodlagos rosszabbodást.

A jövőbeli terápiás irányvonalak meghatározása szempontjából fontos lenne azt a kérdést megválaszolni, hogy mikor dől el az ischaemiás károsodást szenvedett, de a reperfúzió elején javuló ADC-vel jellemezhető szövet sorsa: már az ischaemia időszakában, vagy a reperfúzió során? Ha ugyanis a reperfúzió elején dől el, hogy mely terület fog másodlagos károsodást mutatni, akkor a reperfúzió indukciója előtt lehetőség nyílna a másodlagos károsodás megakadályozására. Erre többen próbálkoztak állatkísérletekben, s a legsikeresebb terápiáról Matsumoto és mtsai (1999) számoltak be, amikor ciklosporin analógot adva sikerült a másodlagos károsodást patkányokban meghiúsítani.



50. ábra Az ischaemia idején a súlyos ischaemiás károsodást szenvedett szövetben az ADC és az energiametabolizmus akkor sem javul, ha reperfúzió következik be (Irreverzibilis ischaemiás károsodás). Ezzel szemben, az enyhébb ischaemiás károsodást szenvedett agyszövetben az ADC és az energiametabolizmus a reperfúzió korai szakaszában normalizálódik. Ebben a területben az energiastátusz vagy másodlagosan rosszabbodik, vagyis infarktus alakul ki (Irreverzibilis reperfúziós károsodás), vagy tartósan fennmarad a visszaállt energiametabolizmus, azaz a szövet túlél (Helyreállt szövet).

DWI léziók klinikailag TIA-nak megfelelő anamnesis esetén

Oppenheim és mtsai. (2006) megállapították, hogy klinikailag TIA-nak megfelelő tünetek esetén a tünetek idején fennálló DWI lézió a betegek egy részében teljesen visszafejlődött, míg másokban hónapokkal később is kimutatható volt. Az adatok elemzése azt mutatta, hogy a permanens károsodást mutató léziókban nagyobb volt a DWI lézió térfogata és alacsonyabb volt a relatív ADC, mint azokban, amelyek később visszafejlődtek.

Az adatok egyrészt azt igazolták, hogy a klinikailag TIA betegek egy része radiológiai szempontból stroke betegnek minősült, hisz a keringési zavar permanens szöveti károsodást okozott. Ugyanakkor fontos információ az is, hogy a DWI léziók egy része visszafejlődött, ami ismét arra utal, hogy a DWI eltérések nem feltétlenül jeleznek irreverzibilis károsodást. Eredményeink alapján az a legvalószínűbb, hogy a TIA idején látott, de később visszafejlődött DWI pozitivitás eseteiben az energiametabolizmus egy spontán reperfúzió következtében javult, s később rosszabbodás nem jelentkezett (helyreállt szövet). Azoknak a DWI lézióknak a hátterében azonban, melyek hónapokkal később is kimutathatók voltak, akár az ischaemia során kialakult irreverzibilis károsodás (javulást nem mutató szövet), akár egy, a reperfúzió során javuló, majd másodlagosan rosszabbodó energiametabolizmus (másodlagos károsodást mutató szövet) állhatott (50. ábra). Az a tény, hogy az ADC alacsonyabb volt a

permanens károsodást mutató szöveti területben, összhangban áll megfigyeléseinkkel, melyek azt mutatták, hogy az ischaemia végi súlyosabb ADC csökkenés esetén nagyobb a rizikója annak, hogy az ADC a reperfúzió ellenére nem javul (vizsgálatainkban ez megfelelt a "javulást nem mutató" szöveti alcsoportnak). Hasonló eredményről számoltak be Lutsep és mtsai. (2001), akik szintén azt találták, hogy az ADC az akut szakban szignifikánsan alacsonyabb volt abban a területben, ahol a DWI lézió tartósan megmaradt, szemben azzal a területtel, ahol a DWI lézió visszafejlődött.

A perfúziós-diffúziós mismatch értelmezése

Az a tény, hogy az akut szakban látott DWI lézió visszafejlődhet, egyben azt is jelenti, hogy a diffúziós-perfúziós mismatch koncepció, miszerint a DWI lézió az irreverzibilis károsodást elszenvedett ischaemiás magot, a mismatch pedig a penumbrát jelzi, nem tartható. Nem tartható egyrészt amiatt, mert enyhe DWI szignál változás és enyhe ADC csökkenés már a penumbra területében is kimutatható, vagyis nemcsak a PWI-DWI mismatch tekintendő a penumbrának, de a DWI lézió egy része is. Másrészt, ha recirkuláció történik, a DWI lézió teljesen visszafejlődhet, mint ahogy erre a fent idézett tanulmányok is utaltak, vagyis a DWI lézió semmiképpen nem jelez feltétlenül irreverzibilis károsodást.

5.1.5.2. A mechanikus MCAO modell alkalmazása tranziens fokális cerebrális ischaemiában

Egyórás MCAO-t követően, amennyiben az ischaemiás szövet régiójában a véráramlást sikerül helyreállítani, jó esély van az ischaemiás károsodás visszafordítására. Ismert, hogy a reperfúzió dinamikája, mely különbözik az átmeneti mechanikus vaszkuláris okklúzió utáni és a spontán vagy a trombolízis indukálta recirkuláció során, befolyásolhatja az ischaemiás szövet kimenetelét (Hossmann, 2006).

Mechanikus MCA okklúzió utáni recirkuláció

Az átmeneti mechanikus okklúziós modellt amiatt érte kritika (Hossmann, 2006), mert nem modellezi megfelelően a spontán reperfúzió, vagy az rt-PA indukálta reperfúzió ütemét. Megjegyzendő azonban, hogy az intrakraniális nagyérokklúzió kezelésében egyre inkább előtérbe kerülő mechanikus trombektómia okozta recirkuláció ütemét sokkal inkább tükrözi az átmeneti mechanikus okklúziós modell, mint az rt-PA-val kezelt átmeneti ischaemia. A klinikai adatok azt mutatják, hogy a gyorsabb és teljesebb rekanalizáció jobb kimenetellel párosul, s a tranziens mechanikus okklúzióra jobban emlékeztető trombektómia használata eredményesebb, mint a fokozatos reperfúziót biztosító rt-PA kezelés (Mortimer és mtsai., 2013).

Másodlagos ADC csökkenés trombolízis során emberben

A másodlagos szöveti károsodás meglétét emberben rt-PA-val indukált, illetve mechanikus trombektómiával történő kezelést követő reperefúzió során végzett sorozat MR vizsgálatokkal lehetne bizonyítani (pl. 2 órával és 24 órával a recirkuláció után). A jelenleg elérhető humán adatok 4.5 órán belül végzett trombolízis kezelések előtt, majd azt követően 26 és 54 órával készült MR felvételeken alapulnak (Soize és mtsai., 2015). Azt találták, hogy azokban a voxelekben, melyekben DWI szignál javulás jelentkezett másodlagos károsodás nélkül, magasabb ADC-t és perfúziós szignált mértek az ischaemia idején, mint azokban a voxelekben, melyekben másodlagos károsodás történt. Megjegyzendő, hogy a másodlagos károsodást jelző voxelekben pedig a permanens károsodást mutató voxelekhez képest volt magasabb ADC és perfúziós szignál az ischaemia időszakában. (Soize és mtsai. adataival szemben mi az ischaemia idején mért ADC alapján nem tudtuk előrejelezni, hogy a recirkuláció korai szakában bekövetkező energiastátusz javulás után mely pixelekben alakul ki másodlagos károsodás, s melyekben nem.) Bár ez a tanulmány mindenképpen hiánypótló, azonban szerencsésebb lett volna egy, a reperfúzió utáni korábbi időszakban elvégzett MR vizsgálattal megnézni, hogy jelentkezik-e korai DWI szignál javulás, majd egy későbbi felvétellel, hogy mennyire volt tartós ez a javulás. Mivel a trombolízis kezelés után nehéz kiszámítani, hogy mikor következik be reperfúzió, célravezetőbb lenne ezt a vizsgálatot mechanikus trombektómia után elvégezni.

5.2. HUMÁN TANULMÁNYAINK EREDMÉNYEINEK MEGBESZÉLÉSE

Mint azt a bevezetőben írtuk, a cerebrális rezisztenciaerek átmérőjét számos mechanizmus befolyásolja. A vérnyomás agyi mikroerekre kifejtett hatását autoreguláció, a neuronális aktivitás hatására kialakuló vazomotor választ neurovaszkuláris kapcsolat, míg az egyéb kémiai ágensek hatására létrejövő áramlásváltozást cerebrális vazoreaktivitás néven ismerjük. A fenti, egymástól eltérő mechanizmusok végsősoron egy effektor szerven, nevezetesen az agy kontraktilis tulajdonsággal bíró mikroerein hatva befolyásolják az agyi erek átmérőjét, s ezen keresztül a cerebrovaszkuláris rezisztenciát és az agyi vérátáramlást. A fenti mechanizmusok részben az agyi véráramlás állandóságát biztosítják a szisztémás vérnyomás széles határai között (autoreguláció), másrészt elősegítik a regionális vérátáramlásnak a mindenkori neuronális aktiváció támasztotta metabolikus igényekhez történő adaptációját (neurovaszkuláris kapcsolat). Bár kísérleti körülmények között a megváltozott vérnyomás, neuronális aktiváció, vérgáz értékek és egyéb humorális faktorok agyi érrendszerre gyakorolt hatása elkülöníthető, a mindennapi élet során egy integrált szabályozással kell számolnunk, melynek eredőjeként alakul ki az agyi érellenállás és áramlás. Munkánkban az akut alkoholfogyasztás hatását vizsgáltuk az agyi autoregulációra, emellett stroke rizikófaktorokban (dohányzás), vazokonstrikciót (hipokapnia, NASID szerek) és vazodilatációt (acetazolamid) kiváltó tényezők jelenlétében és vakokban tanulmányoztuk az occipitalis kérgi stimuláció kiváltotta neurovaszkuláris kapcsolatot. Kutatásainkban tehát az agyi véráramlás élettanát (látók és vakok vizsgálata), valamint stroke rizikófaktorokban (dohányzás, alkohol) és a rezisztenciaerekre ható különböző tényezők (acetazolamid hipokapnia, NSAID) jelenlétében az agyi keringést vizsgáltuk. A vakok bevonásával egy nagy létszámú fogyatékos csoportban tanulmányoztuk a látszólag funkcióval nem bíró látókéreg szerepét, s a többi esetben is nagyszámú beteget, illetve gyakran előforduló állapotot érintő kérdést vizsgáltunk: a dohányzás és az alkoholfogyasztás világszerte népbetegségnek számít, NSAID tartalmú szert a korral járó mozgásszervi panaszok miatt az idősek meglehetősen gyakran szednek, míg a hiperventiláció akaratlanul is sokszor megjelenik az életünkben különböző fizikai aktivitás során.

5.2.1. Rizikófaktorok hatása az agyi véráramlás szabályozására

5.2.1.1. Az akut alkoholfogyasztás hatása a cerebrális hemodinamikai változásokra egészséges személyekben ortosztatikus stressz (HUT teszt) során

Kihasználva, hogy a transzkraniális Doppler módszer a vérnyomás szimultán mérésével az autoreguláció tanulmányozására is alkalmas, azt vizsgáltuk, hogy az ortosztatikus reakció során hogyan változik a cerebrális keringés, s azt befolyásolja-e az akut alkoholfogyasztás.

Egészséges egyénekben az artériás vérnyomás felállást követően észlelhető csökkenése néhány másodpercen belül kompenzálódik, melynek eredményeként az artériás középvérnyomás értékek hasonlóak lesznek álló és fekvő helyzetben. Álló helyzetben a vénás visszaáramlás csökken és ez a verőtérfogat csökkenéséhez vezet. Ahhoz, hogy a vérnyomás

ennek ellenére változatlan maradjon, a felállás során a kardiovaszkuláris rendszerben több kompenzatorikus folyamat történik. Ezek egyike a baroreceptor reflex, mely a vagus hatás gátlásán és a szimpatikus aktivitás növelésén keresztül kompenzatorikus tachycardiát eredményez és növeli a szimpatikus vazomotor tónust és ezzel a szisztémás vaszkuláris rezisztenciát (Smith és Ebert, 1990; Ishibashi és mtsai., 2005, Cooke és mtsai., 2009). Ha ezek a kompenzatorikus mechanizmusok nem megfelelően szabályozottak, ortosztatikus hipotenzió jelentkezhet és ennek következményeként csökkent agyi perfúzió. Számos olyan állapot ismert, mely befolyásolja a fent említett, finoman szabályozott fiziológiai reflex mechanizmusokat. Ezek egyike az alkoholfogyasztás, mely az egyik ismert kiváltó oka az ortosztatikus diszfunkciónak, mely neurokardiogén syncopehoz vezethet (Narkiewicz és mtsai., 2000; Tateoka és mtsai., 2007; Takahashi és mtsai., 2008; Carter és mtsai., 2011). Az akut alkoholfogyasztásnak ezt a hatását az izmok szimpatikus idegi aktivitásának a gyengülése (Carter és mtsai., 2011), a szisztémás vazokonstrikció csökkenése (Narkiewicz és mtsai., 2000), valamint a vazokonstriktor eikozanoidoknak az alkoholbevitelt követően gyorsan csökkenő szintje okozza (Barden és mtsai., 2013). Az alkoholhoz köthető fent említett változások, akár a szimpatikus aktivitás csökkenése, akár a vazokonstriktor vegyületek alacsonyabb szintje váltja is ki azokat, hozzájárulhatnak a hipotenzióhoz, illetve a nem megfelelő vérnyomásváltozáshoz ortosztatikus terhelés során. Bár az ortosztatikus toleranciát nemcsak a szisztémás, hanem az agyi hemodinamikai változások is befolyásolhatják, egy tanulmány sem tűzte ki célul, hogy specifikusan megvizsgálja az akut alkoholfogyasztás agyi vazoreaktivitásra kifejtett hatását HUT teszt során.

Tanulmányunkban az alkohol akut hatását vizsgáltuk a HUT teszt által kiváltott szisztémás és agyi hemodinamikai változásokra egészséges önkéntesekben. Célunk az enyheközepes ittasság hatásának a vizsgálata volt, ezért 1 ‰ körüli alkohol koncentráció elérését céloztuk meg, melyet sikerült megközelíteni (ennek 1 órán belüli eléréséhez átlagos testtömegű személynek 1.2-1.5 dL vodkát vagy 4-5 dL bort kell fogyasztani). A vérnyomás és a szívfrekvencia mellett az arteria cerebri media (MCA) áramlási sebességét és az MCA szintjére korrigált vérnyomásból, illetve az MCA áramlási sebességértékeiből számított cerebrovaszkuláris rezisztenciát is monitoroztuk fekvő és függőleges helyzetben, alkoholfogyasztás előtt és után.

Eredményeink bizonyították, hogy **az enyhe, illetve középsúlyos ittasságot okozó alkoholfogyasztás** nem befolyásolta érdemben a fekve vizsgált alapvető hemodinamikai paramétereket, ugyanakkor **módosította az ortosztatikus stressz által indukált hemodinamikai válaszokat**. Az alkohol hatása alatt végzett HUT teszt során szignifikánsan nagyobb mértékben nőtt a szívfrekvencia, mint az alkoholfogyasztás előtt, azonban ennek ellenére kevésbé emelkedett a szisztémás artériás középnyomás és kifejezettebb volt az MCA szintjére korrigált vérnyomás (mBPMCA) és az MCA-ban mért áramlási sebesség (MFVMCA) csökkenése. A vizsgálat három fő új eredménye a következőképp foglalható össze: 1) Az MFVMCA csökkenése a HUT teszt okozta ortosztatikus stressz során jelentősebb volt az alkohol hatása alatt, mint a kontroll periódusban. 2) Alkoholbevitel előtt a HUT teszt indukálta MFVMCA relatív csökkenése szignifikánsan kisebb volt, mint az mBPMCA relatív csökkenése, míg alkoholfogyasztás után a MFVMCA csökkenés és az mBPMCA csökkenés mértéke nem különbözött szignifikánsan. 3) Míg a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index a kontroll periódus HUT fázisában csökkent, addig alkoholfogyasztás után a HUT teszt során növekedést mutatott.

Ezek az eredmények a kontroll periódus HUT fázisában az autoreguláció működését jelezték, mely a felállás miatt kialakult alacsonyabb mBPMCA értéken a cerebrális vazodilatáció által mérsékelte az MCA áramlási sebességének a csökkenését. Ugyanakkor, **alkoholfogyasztás után az mBPMCA és az MFVMCA értékek ortosztatikus stressz során megfigyelt hasonló mértékű csökkenése és a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index csökkenésének a hiánya arra utalt, hogy az alkohol a csökkent mBPMCA értéken az agyi rezisztenciaerek kompenzatorikus vazodilatációját gátolta, vagyis károsította az agyi autoregulatiót**. Eredményeink azt jelzik, hogy az akut alkoholfogyasztás nem csupán a hipotenzív hatása által fokozhatja a csökkent ortosztatikus tolerancia (és így a syncope), valamint a stroke rizikóját, hanem az agyi véráramlás szabályozásának befolyásolása, károsítása révén is.

A HUT teszt hatása a hemodinamikai paraméterekre

Miután a dönthető asztalt álló helyzetbe döntöttük, mind alkoholfogyasztás előtt, mind utána magasabb szívfrekvencia, szisztolés, diasztolés és arteriás középvérnyomás értékeket találtunk, összehasonlítva a hanyatt fekvő helyzetben mért értékekkel. Megfigyeléseink összhangban vannak korábbi tanulmányok eredményeivel, melyek az ortosztatikus stressz során kompenzatórikus tachycardiát (Ishibashi és mtsai., 2005; Maule és mtsai., 1993; Krakow és mtsai., 2000; Zaidi és mtsai., 2000; Hilz és mtsai., 2002; O'Leary és mtsai., 2007; Shaw és mtsai., 2014; Yang és mtsai., 2015) és változatlan vagy emelkedett vérnyomás értékeket jeleztek a HUT fázisban, a nyugalmi, fekvő állapothoz képest ((Ishibashi és mtsai., 2005; Maule és mtsai., 1993; Krakow és mtsai., 2000; Zaidi és mtsai., 2000; Hilz és mtsai., 2002; O'Leary és mtsai.; Porta és mtsai., 2011). Az alapvető hemodinamikai paramétereknek ezek a változásai ismert válaszok az ortosztatikus reakcióra, melynek során a vértérfogat eloszlása és a test különböző részein mérhető nyomásértékek alapvetően megváltoznak. A dönthető asztal dőlésszögétől függően a vérnyomás a test alsóbb részeiben emelkedik, miközben a test felsőbb részeiben csökken. Ennek kompenzálására felálláskor/felállításkor, elsősorban a baroreceptor reflexnek köszönhetően, számos változás jelentkezik a kardiovaszkuláris rendszerben, beleértve a tachycardiát és az emelkedett szimpatikus vazomotor tónust. Ezek a reflex-mechanizmusok teszik lehetővé a szisztémás vérnyomás, és így az agyi perfúzió fenntartását.

Az alkohol hatásai a HUT teszt által kiváltott hemodinamikai változásokra

Az alkoholnak az alapvető hemodinamikai paraméterekre gyakorolt akut hatásait tekintve a tudományos eredmények meglehetősen heterogének. Az alkoholfogyasztás utáni órákban korábbi tanulmányok jelentettek megnövekedett (Grassi és mtsai., 1989; Ireland és mtsai., 1984; Rush és mtsai., 1989) vagy változatlan (Maule és mtsai., 1993) szívfrekvenciát, és megnövekedett (Grassi és mtsai., 1989; Ireland és mtsai., Morvai és mtsai., 1988), csökkent (Barden és mtsai., 2013; Rush és mtsai., 1989), vagy változatlan (Maule és mtsai., 1983), vérnyomásértékeket. A fekvő helyzetben mért adataink azt mutatták, hogy az alacsony vagy közepes szintű véralkohol koncentráció nem volt lényeges hatással a nyugalmi szívfrekvenciára és vérnyomásértékekre.

Az alkohol HUT teszt által kiváltott hemodinamikai változásokra gyakorolt hatásait széleskörűen vizsgálták különböző betegségekben, mint pl. syncope-ban (Takahashi és mtsai., 2008), post-alkoholos syncope-ban (Takeoka és mtsai., 2007), "tiszta autonóm zavar"-ban és multiszisztémás atrófiában (Chaudhuri és mtsai., 1994), posturalis tachycardia szindrómában (del Pozzi és mtsai., 2014), ortosztatikus intoleranciában (Lin és mtsai., 2011b), sclerosis multiplexben (Gonul és mtsai., 2008; Mezei és mtsai., 2013), krónikus fáradtság szindrómában (Razumovsky és mtsai., 2003), familiáris dysautonomiában (Hilz és mtsai., 2002) és Parkinson-kórban (Niehaus és mtsai., 2002). Ugyanakkor meglehetősen kevés közlés érhető el az etanolnak a hemodinamikai változásokra gyakorolt hatásairól ortosztatikus terhelés során egészséges egyénekben (Narkiewicz és mtsai., 2000; Carter és mtsai., 2010; Maule és mtsai., 1993). Ráadásul, legjobb tudomásunk szerint az egészséges személyekben végzett tanulmányok egyike sem célozta az akut alkoholfogyasztásnak a HUT teszt által kiváltott agyi hemodinamikai változásokra gyakorolt hatásainak specifikus vizsgálatát. A fentebb említett tanulmányokból és más vizsgálatok kontroll alanyaiból származó adatok (Narkiewicz és mtsai., 2000; Carter és mtsai., 2010; Maule és mtsai., 1993) összehasonlítása és értékelése meglehetősen nehéz, mert eltérő módszereket (HUT teszt /Maule és mtsai., 1993/, vagy alsó testfélre kifejtett negatív nyomás teszt /Narkiewicz és mtsai., 2000; Carter és mtsai., 2010/) alkalmaztak, és még ha HUT tesztet végeztek is, a döntés szöge, az alkoholkoncentráció, illetőleg a HUT fázis időtartama különböző volt.

Az irodalomban elérhető eredményeket összegezve elmondható, hogy az alkohol az erek vazodilatációját okozta a mesenterialis artériák ellátási területében (Maule és mtsai., 1993), megváltoztatta az izmok szimpatikus idegi szabályozását (Carter és mtsai., 2010), csökkentette az alkari vaszkuláris rezisztenciát (Narkiewicz és mtsai., 2000), és hozzájárult a vazokonstriktor eikozanoidok koncentrációjának csökkenéséhez (Barden és mtsai., 2013). Ezek az alkohol okozta változások, akár direkt vazodilatáció, akár a szisztémás vazokonstrikció gátlása révén, fokozták a hipotenzív hatást vagy a vérnyomás kevésbé jelentős növekedését eredményezték ortosztatikus stressz során. Eredményeink egybehangzanak ezekkel a megfigyelésekkel: azt találtuk, hogy a szívfrekvencia HUT fázisban történő szignifikánsabb növekedése ellenére a vérnyomás növekedése kevésbé volt jelentős alkohol hatása alatt, mint a kontroll periódusban, ami a baroreceptorok által közvetített vazomotor reflex károsodását jelezte alkoholbevitelt követően.

Annak érdekében, hogy megfelelően értelmezhessük a vérnyomás és az áramlási sebesség változásait a HUT teszt során, ki kellett számítanunk az MCA szintjére korrigált vérnyomásértéket (mBPMCA) a HUT pozícióban. Ennek az az oka, hogy a szív és az agy közötti vertikális távolság és így a hidrosztatikai nyomásváltozás következtében a vérnyomásértékek az inszonáció szintjében (mBPMCA) szükségszerűen alacsonyabbak függőleges helyzetben, mint hanyatt fekvő állapotban. Bár a szisztémás artériás középnyomás mind az alkoholfogyasztás előtt, mind azt követően növekedett az ortosztatikus stressz alatt, a hidrosztatikai hatás figyelembe vételével meghatározott MCA szintjére korrigált vérnyomás (mBPMCA) szignifikánsan alacsonyabb volt a HUT pozícióban, mint a vízszintes helyzetben (**7. táblázat**). Az mBPMCA kiszámítása és az MFVMCA mérése lehetővé tette, hogy meghatározzuk a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia indexet, amit a tudományos irodalomban agyi autoregulatiós indexeként is használnak (Edwards és mtsai., 2002).

Az alkohol hatása az agyi véráramlás és a cerebrovaszkuláris rezisztencia változásaira HUT teszt során

Azokkal a közlésekkel szemben, melyek az agyi véráramlás növekedését írták le alacsony dózisú alkohol hatására (Sano és mtsai., 1993; Schwartz és mtsai., 1993; Tolentino és mtsai., 2011), tanulmányunkban nem találtunk szignifikáns eltérést a kiindulási, vízszintes helyzetben mért MCA véráramlási sebességben alkoholbevitel előtt és után. A dönthető asztal álló helyzetbe emelését követően az MCA áramlási sebesség csökkent a HUT teszt során alkoholfogyasztás előtt és után egyaránt. Eredményeinkhez hasonlóan mások szintén alacsonyabb MCA áramlási sebességértékeket találtak függőleges helyzetben a fekvő állapotban mért kiindulási értékekhez képest egészséges személyekben (Krakow és mtsai., 2000; Hilz és mtsai., 2002; Gonul és mtsai., 2008; Carey és mtsai., 2003). Adataink azt mutatták, hogy az MFVMCA értékek csökkenése jelentősebb volt alkohol hatása alatt, mint alkoholbevitel előtt. Ezt a különbséget a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index magyarázhatja, ami csökkent a kontroll periódusban, az alkoholfogyasztás előtt végzett HUT teszt során, de alkoholfogyasztást követően hasonló változás nem volt. A cerebrovaszkuláris rezisztencia megfelelő csökkenésének hiánya alkohol hatása alatt arra utalt, hogy az alkohol gátolta az ortosztatikus terhelés során szignifikánsan csökkent mBPMCA értéken egyébként fiziológiásan jelentkező kompenzatorikus cerebralis vazodilatációt. Az agyi rezisztenciaerek kompenzatorikus vazodilatációjának az elmaradása miatt az mBPMCA csökkenéssel gyakorlatilag párhuzamosan, a nyomáscsökkenést mintegy passzíve követve csökkent az agyi véráramlás és így az agyi véráramlási sebesség a fő intrakraniális artériákban. Ezzel szemben, alkoholfogyasztás előtt a cerebrovaszkuláris rezisztencia index csökkent, mely az agyi rezisztenciaerek dilatációját jelezte, s ez a kompenzatorikus vazodilatáció tompította az mBPMCA csökkenés mellett jelentkező áramlási sebességcsökkenést a kontroll periódusban. Az mBPMCA és az MFVMCA értékek HUT teszt által kiváltott relatív változásainak összehasonlítása a kontroll és a teszt periódusokban az alkohol agyi keringésre gyakorolt potenciális hatásait illetően további új ismeretekre világított rá (32. ábra). A kontroll periódusban az MFVMCA értéknek az mBPMCA csökkenéséhez képest szignifikánsan kisebb relatív csökkenése működő autoregulatióra utalt, mely mérsékelte az áramlási sebesség csökkenését alacsonyabb mBPMCA szinteken. Ezzel ellentétben az MFVMCA és az mBPMCA alkohol hatása alatti hasonló relatív csökkenése azt jelezte, hogy az agyi autoreguláció nem volt eléggé hatékony ahhoz, hogy kompenzálja az mBPMCA esését, ezért az MFVMCA csökkenése passzív módon követte a vérnyomás (mBPMCA) változását. Ezek az eredmények – a cerebrovaszkuláris rezisztencia index adataival együtt, ami a kontroll periódussal ellentétben az alkoholfogyasztás után nem csökkent a HUT fázis során (33. ábra) - azt a feltevést támogatták, hogy alacsonyabb vérnyomásértékeken az alkohol gátolta a cerebrális rezisztenciaerek megfelelő vazodilatációját, vagyis károsította az agyi autoregulatiót.

Bár egyik egészséges önkéntesnek sem volt syncope-ja a 10 perces HUT fázis során, eredményeink mégis arra utalnak, hogy az alkohol nem csupán a hipotenzív hatása, hanem az agyi véráramlás szabályozásának megváltoztatása által is hozzájárulhat az ortosztatikus tolerancia károsodásához (Tateoka és mtsai., 2007; Takahashi és mtsai., 2008). Ráadásul, a vazomotor reflex és az agyi autoreguláció akut alkoholfogyasztás okozta károsodása, melyet vizsgálatunkban már az alkoholfogyasztás után 1 órával kimutattunk, nem csupán

ortosztatikus intoleranciával társulhat, de fokozhatja a stroke kockázatát is. Az akut alkoholfogyasztásnak ez utóbbi káros hatása a közelmúltban vált ismertté: 23 tanulmány szisztematikus áttekintésével és dózis-válasz meta-analízisével, csaknem 30 000 résztvevő adata alapján azt találták, hogy közvetlenül az alkoholfogyasztás után a stroke kockázata körülbelül kétszeresre nőtt (Mostofsky és mtsai., 2016).

Összefoglalás, következtetés

Az MCA szintjére korrigált vérnyomás csökkenésével párhuzamosan csökkenő MCA áramlási sebesség és a cerebrovaszkuláris rezisztencia index növekedése az alkoholfogyasztást követő periódusban azt jelezték, hogy alacsonyabb mBPMCA értéken az alkohol gátolta az agyi rezisztenciaerek kompenzatorikus vazodilatációját, vagyis károsította az agyi autoregulatiót. Az akut alkoholfogyasztásnak ezek a károsító hatásai, beleértve a vazomotor reflex és az agyi véráramlás szabályozásának a károsodását, hozzájárulhatnak az ortosztatikus tolerancia csökkenéséhez és a stroke kockázat növekedéséhez.

Megfigyeléseink arra hívják fel a figyelmet, hogy nemcsak a krónikus, de az akut alkoholfogyasztás is fokozza a stroke rizikót, illetve akut alkoholfogyasztás után nemcsak az alkohol egyensúlyra gyakorolt negatív hatásával, de az ortosztatikus toleranciát károsító hatásával is számolni kell.

5.2.1.2. A dohányzás és a dohányzás elhagyásának hatása a vizuális stimuláció kiváltotta áramlási válaszra

A dohányzás elleni küzdelem ellenére, a dohányzás még mindig világszerte elterjedt, hozzájárulva ezzel nemcsak a dohányzók, de a passzív dohányosok egészségének károsításához is. Jól ismert, hogy a dohányzás endotheliális diszfunkciót, trombocita aktivációt okoz, fokozza a gyulladásos folyamatokat, hiperkoagulabilitáshoz és a vazokonstrikciós hajlam fokozódásához vezet (Lassila és mtsai., 1988; Vapaatalo és Mervaala, 2001), hozzájárul a szabadgyökök fokozott képződéséhez és ezáltal az NO bioaktivitás csökkenéséhez (Raij és mtsai., 2001). Emellett a cigarettafüst nagy reaktivitású glikációs termékek, az úgynevezett glikotoxinok képződéséért felelős, melyek a fehérjéket károsítják, s DNS mutációt okoznak (Cerami és mtsai., 1997). Bizonvították továbbá, hogy a glikotoxinok keresztkötésket hoznak létre a kötőszöveti kollagének között, gátolják az NO aktivitást, módosítják az ApoB szerkezetét, s ezáltal megakadályozzák az LDL-koleszterol szöveti LDL receptoron keresztül történő felvételét (Kohn és mtsai., 1984; Bucala és mtsai., 1991; Bucala és mtsai., 1995). Kimutatták, hogy a krónikus dohányzás hatására csökken a nyugalmi vérátáramlás (Kubota és mtsai., 1983; Rogers és mtsai., 1983; Rogers és mtasi., 1985; Yamashita és mtsai., 2000), ugyanakkor a krónikus dohányzás cerebrális vazomotor reaktivitásra kifejtett hatását csak kevés tanulmányban vizsgálták. Márpedig fontos annak a kérdésnek a tisztázása, hogy a dohányzás károsítja-e a vazodilatációs mechanizmusokat, mivel a vazodilatáció károsodása növelheti a stroke rizikót és ronthatja az ischaemiás stroke kimenetelét. Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a dohányzás károsítja-e a vizuális stimuláció és a következményes occipitalis kérgi aktiváció kiváltotta áramlási választ a PCAban, s ha igen, akkor ez a károsodás reverzibilis-e a dohányzás elhagyása után.

A dohányzás hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Eredményeink igazolták, hogy a krónikus dohányzás szignifikánsan gátolta a vizuális stimulus kiváltotta agyi vazomotor reaktivitást. Tudomásunk szerint ez volt az első TCD tanulmány, mely egyébként egészséges dohányosokban a neurovaszkuláris kapcsolat károsodását jelezte. A dohányzás neurovaszkuláris kapcsolatot károsító hatása hátterében a dohányzás akut hatását valószínűtlennek tartjuk, hisz az önkéntesek a vizsgálat előtti 9 órában nem dohányoztak. Bár a krónikus dohányzás fontos szerepet játszik az ateroszklerózis kifejlődésében, egyrészt a vizsgált önkéntesek fiatalok voltak, másrészt az IMT a két csoport között nem igazolt szignifikáns eltérést, valószínűtlenné téve ezzel az érelmeszesedés oki szerepét a csökkent vazomotor reaktivitás hátterében. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a dohányzás az endothelsejtek károsításán, valamint a vazodilatációért felelős faktorok szintézisének gátlásán és inaktivációján keresztül járulhat hozzá a neurovaszkuláris kapcsolat károsodásához.

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy az akutan belégzett cigarettafüst növeli az agyi vérátáramlást (Boyajian & Otis, 2000; Terborg és mtsai., 2002; Wennmalm, 1982), míg a krónikus dohányzás hatására ez az érték csökken. A krónikus dohányzás cerebrovaszkuláris reaktivitásra gyakorolt hatását csak kevesen vizsgálták. Xenon belégzés módszerrel vizsgálva az agyi vérátáramlást, Rogers és mtasi. (1984) csökkent vazodilatátor és vazokonstriktor reaktivitást találtak 5% CO₂ és 100% O₂ belégzést követően. Ezeket az eredményeket krónikus dohányosokban mások légzésvisszatartási tesztet alkalmazva nem tudták megerősíteni (Silvestrini és mtsai., 1996; Terborg és mtsai., 2002). Eredményeink, melyek a vizuális stimulus indukálta áramlási válasz csökkenését igazolták fiatal, egyébként egészséges dohányosokban, a krónikus dohányzás cerebrális vazodilatációra gyakorolt negatív hatásának a meglétét támogatták.

A dohányosokban tapasztalt csökkent cerebrális vazodilatáció hátterében mind morfológiai, mind funkcionális eltérések állhatnak. Jól ismert, hogy a dohányzás morfológiai eltéréseket okoz az endothelsejtekben, növeli a keringésben található károsodott endothelsejtek számát (Vapaatalo és Mervaala, 2001), s hozzájárulhat az arteriola remodelling jelenségéhez is (Guo és mtsai., 2006). A morfológiai eltérések mellett a dohányzás endothelium funkciójára gyakorolt negatív hatását is kimutatták (Celermajer és mtsai., 1993). A cigarettafüstben lévő oxidánsok inaktiválják az NO-t és elősegítik az LDL-C oxidációját (Bucala és mtsai., 1991; Bucala és mtsai., 1995; Raij és mtsai., 2001), gátolják az endotheliális és neuronális NO-szintázt, s ezáltal csökkentik az endogén NO termelés indikátorának tartott kilégzett NO tartalmat (Raij és mtsai., 2001; Demady és mtsai., 2003; Landmesser és mtsai., 2005). A neuronális és endotheliális NO szintáz gátlása állatkísérletekben csökkentette a neuronális aktiváció okozta agyi áramlásváltozás mértékét, mely az NO neurovaszkuláris kapcsolatban betöltött alapvető szerepére utalt (Cholet és mtsai., 1997; Demady és mtsai., 2003; Kharitonov és mtsai., 1995; Yang és Iadecola, 1998). Krónikusan dohányzókban a csökkent NO produkciót a potens vazokonstriktor és proliferatív hatással bíró endothelin fokozott termelése kísérte (Haak és mtsai., 1994), emellett fokozott trombocita aktivációt és következményesen emelkedett tromboxán szintet észleltek (Lassila és mtsai., 1988; Patel és Kent, 1988). Az NO, mint vazodilatátor és az endothelin és tromboxán, mint vazokonstriktor molekulák, valamint a fokozott szimpatikus tónus mind

hozzájárulhatnak a dohányosokban bizonyított károsodott agyi vazodilatációhoz és fokozott vazokonstrikcióhoz. Elmondható tehát, hogy a dohányzás mind a vazodilatációért felelős faktorok termelésének gátlásán, inaktivációján, mind morfológiai eltéréseket okozva (endothelsejt károsodás, kötőszöveti kollagénrostok közötti keresztkötések kialakítása, arteriola remodelling) gátolhatja a cerebrovaszkuláris reaktivitást, s ezen belül a neurovaszkuláris kapcsolatot. Mivel a legtöbb krónikus dohányzás hatását vizsgáló tanulmány az endotheliális diszfunkció és az NO bioaktivitás csökkenését hangsúlyozta, elvileg megpróbálható lenne ezeket dohányosokban kezelni. Humán tanulmányokban igazolták, hogy a statinok, függetlenül az aktuális koleszterinszinttől, valamint az L-arginin adása javíthatja a károsodott vazodilatációt (Beckman és mtsai., 2004; Zimmermann és mtsai., 2003). Mégis, a dohányzás okozta káros hatások megelőzésében és kezelésésében a leglogikusabb, legészszerűbb és leghatékonyabb módszer a dohányzás mellőzése, vagy az arról történő időbeni leszokás.

Eredményeink és a fenti adatok azt sugallják, hogy a dohányzás az ischaemiás stroke rizikóját nemcsak az aterotrombózis, hanem a csökkent agyi vazodilatáció révén is fokozza. A csökkent cerebrális vazodilatáció carotis stenosis és egyéb okból csökkent agyi perfúziós nyomás esetén hozzájárulhat a cerebrális ischaemia kialakulásához, illetve a penumbrában lévő vérátáramlás csökkentése révén ronthatja az ischaemiás károsodás kimenetelét (Vernieri és mtsai., 1999).

A dohányzás elhagyásának hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Azt, hogy a neuronális aktiváció okozta áramlási válasz, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolat károsodása reverzibilis-e a dohányzás elhagyása után, egy másik tanulmányban vizsgáltuk. Vizsgálatunk előtt a dohányzás elhagyásának a nyugalmi agyi véráramlásra gyakorolt hatásáról voltak közlések, de a dohányzás elhagyásának a cerebrovaszkuláris reaktivitásra gyakorolt hatását tudomásunk szerint előttünk nem vizsgálták. Krónikusan dohányzókban csökkent nyugalmi agyi vérátáramlásról számoltak be (Kubota és mtsai., 1983; Rogers és mtsai., 1985; Yamashita és mtsai., 2000), mely a dohányzás elhagyása után javult. Rogers és mtsai.(1985) már 1 évvel, míg mások (Yamashita és mtsai., 2000) csak néhány évvel a cigaretta elhagyása után észlelték az agyi véráramlás szignifikáns javulását.

TCD vizsgálatainkkal először igazoltuk, hogy **fiatal, egyébként egészséges** személyekben még 6-18 hónappal a dohányzás elhagyása után is kóros volt a neuronális aktiváció kiváltotta áramlási válasz, ami a neurovaszkuláris kapcsolat dohányzás okozta hosszútávú károsodását jelezte. A dohányzás elhagyása után még hónapokkal később is kóros neurovaszkuláris kapcsolat hátterében inkább egy, a dohányzás okozta morfológiai eltérés, semmint egy akut, átmeneti vaszkuláris diszfunkció meglétét valószínűsítettük. A lélegzetvisszatartási teszt eredménye azt igazolta, hogy nemcsak a neuronális aktiváció kiváltotta áramlási válasz, de a hiperkapnia indukálta cerebrovaszkuláris reaktivitás is károsodott mind a dohányosokban, mind a korábbi dohányosokban, ami az agyi rezisztenciaerek vazodilatációs képességének a csökkenését jelezte. Mindez arra hívta fel a figyelmet, hogy a krónikus dohányzás fiatal, egészséges személyekben, az ateroszklerózis markerének tartott IMT érdemi változása nélkül is több mint fél éven túl károsítja a cerebrális vazoreaktivitást. Ugyanakkor biztató trendként megfigyeltük, hogy a permanens
dohányosokhoz képest egy javulási folyamat a dohányzás elhagyása után elindult, mely a vizuális stimuláció kiváltotta maximális érválasz tekintetében mutatkozott meg leginkább. **Bár a vizuális stimuláció kiváltotta maximális relatív sebességváltozás a korábbi dohányosokban még kisebb volt, mint a nem dohányzókban, de már nagyobb, mint a permanens dohányosokban.** Ezek a változások a dohányzást elhagyókban nagyon hasonlítanak a stroke rizikóban megfigyelt változásokhoz: a stroke rizikó is csökken a dohányzásról való leszokás után, de még évek múlva sem tér vissza a nem dohányzókban mérhető szintre (Bullen, 2008). Adataink arra öszötönözheti az orvosokat és a betegeket, hogy mindent tegyenek meg a dohányzásról való leszokás sikeréért.

Tanulmányunkban a dohányzás elhagyása után még 6-18 hónappal is kimutatható károsodott cerebrovaszkuláris reaktivitást elméletileg okozhatta károsodott neuronális aktiváció, a neuronok-asztrociták és az endothelsejtek közötti kapcsolat zavara, valamint a dohányzás okozta károsodott cerebrális vazodilatáció is. Mivel azonban a neuronális aktivációt jelző VEP paraméterek a dohányosokban és korábbi dohányosokban nem különböztek a nem dohányzókban mért értékektől, a neuronális aktiváció károsodása nem magyarázta a dohányosokban és korábbi dohányosokban észlelt neurovaszkuláris kapcsolat zavarát. A dohányzás akut hatása, mint a fokozott trombocita aktiváció és aggregabilitás, a vér emelkedett karboxihemoglobin tartalma, vagy a cigarettafüstben lévő szabadgyökök okozta NO inaktiváció mindegyike károsíthatja a cerebrovaszkuláris választ, de csak átmenetileg (Morita és mtsai., 2005; Giannini és mtsai., 2007; Tsuchiya és mtsai., 2002). Márpedig, vizsgálatunk azt igazolta, hogy a dohányzás elhagyása után még legalább 6 hónappal is gátolt volt a neurovaszkuláris kapcsolat és a hiperkarbia kiváltotta cerebrális vazomotor reaktivitás, mely valószínűtlenné tette a dohányzás akut hatásának az oki szerepét. Bár szignifikáns IMT eltérés nem volt a csoportok között, az arteria és arteriola remodelling nem zárható ki a tartósan fennálló vaszkuláris válasz károsodása hátterében, mint ahogy ezt igazolták is állatkísérletben (Guo és mtsai., 2006). A diabeteszes betegekhez hasonlóan, a cigarettafüstben kimutatható reaktív aldehidek előrehaladott glikációs végtermékek képződéséhez vezetnek, melyek számos intra- és extracelluláris fehérjének nemcsak a funkcióját, hanem a struktúráját is megváltoztathatják, s így tartós vaszkuláris károsodást okozhatnak (Kohn és mtsai., 1984; Bucala és mtsai., 1991; Bucala és mtsai., 1995; Cerami és mtsai., 1997). A vaszkuláris remodelling és a glikációs végtermékek szerepe mellett nem hagyható figyelmen kívül a gátolt NO szintézis potenciális hatása sem a tartósan csökkent vazomotor reaktivitás hátterében a korábbi dohányosok csoportjában. Robbins és mtsai. (1997) írták le, hogy bár a dohányzás elhagyását a kilégzett NO tartalom növekedése kísérte, ez még 8 héttel a cigaretta letétele után sem érte el a kontroll értéket, mely az endothelium károsodására és csökkent NO szintézisre utalt.

Összefoglalás, következtetés

Fiatal, egyébként egészséges dohányosokban, csakúgy mint a dohányzásról 6-18 hónappal a vizsgálat előtt leszokó személyekben a neurovaszkuláris kapcsolat és a hiperkarbia kiváltotta vazoreaktivitás is rosszabb volt a nem dohányzókhoz képest, mely a dohányzás agyi vazoreaktivitásra kifejtett hosszútávú negítv hatását jelezte. Ugyanakkor biztató trendként a vizuális stimuláció idején mért maximális áramlási sebességfokozódás már szignifikánsan nagyobb volt azokban, akik elhagyták a dohányzást, mint a permanens dohányosokban. Mindez arra kell, hogy sarkallja az embereket, hogy ne szokjanak rá a dohányzásra, vagy ha már ez megtörtént, akkor a káros érhatások a cigaretta elhagyásával mérsékelhetők.

Eredményeink klinikai jelentősége, hogy dohányosokban a károsodott vazoreaktivitás csökkent perfúziós nyomással járó szignifikáns carotis stenosis esetén hozzájárulhat a stroke kialakulásához, illetve ischaemiás stroke esetén ronthatja a kimenetelt.

5.2.2. Az agyi rezisztenciaerek átmérőjét befolyásoló faktorok hatása a neuronális aktiváció indukálta érválaszra

5.2.2.1. Az acetazolamid kiváltotta vazodilatáció hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Az idegrendszer megfelelő működésének feltétele a mindenkori igényekhez szükséges glükóz és oxigén ellátás folyamatos biztosítása (Roy és Sherrrington, 1890), melyet egy térben és időben precízen kontrollált folyamat, az úgynevezett neurovaszkuláris kapcsolat biztosít az agyi mikroerek vazodilatációján és vazokonstrikcióján keresztül (Metea és Newman, 2006)

Az agyi mikroerek vazodilatációs képességének vizsgálatára a neurovaszkuláris kapcsolat vizsgálatán túl több módszer is használatos, mint az 5-6% szén-dioxid tartalmú levegő belélegeztetése, az ugyancsak a vér parciális szén-dioxid szintjének emelkedését okozó lélegzetvisszatartásos teszt, illetve az acetazolamid (AZ) teszt. Bár a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges cerebrális vazodilatáció hátterét számos tanulmányban vizsgálták, ennek részletes mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. Az sem ismert, hogy a hiperkarbia, az acetazolamid adás és a neurovaszkuláris kapcsolat során kialakuló dilatáció a rezisztenciaerek szintjén azonos, vagy különböző útvonalakon alakul ki.

Mivel a neuronális aktiváció indukálta áramlásváltozás cerebrális vazodilatáció révén valósul meg (Metea és Newman, 2006; Kitaura és mtsai., 2007; Xu és Pelligrino, 2007), a célunk annak a vizsgálata volt, hogy a szignifikáns vazodilatációt előidéző acetazolamid gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolathoz szükséges agyi rezisztenciaerek tágulatát. A kérdést másként megfogalmazva, arra kerestünk választ, hogy a neuronális aktiváció okoz-e további vazodilatációt akkor, amikor a rezisztenciaerekben egy potens vazodilatátor alkalmazásával már szignifikáns dilatációt idéztünk elő. Hogy ezt megválaszolhassuk, 10 egészséges férfiben TCD-vel vizsgáltuk a vizuális stimuláció hatására kialakuló áramlási sebességváltozás mértékét mindkét PCA-ban acetazolamid adás előtt és azt követően. Az áramlási sebességváltozásal párhuzamosan a pulzatilitási index változását is követtük, mely a cerebrovaszkuláris rezisztenciára vonatkozóan nyújtott információt.

Acetazolamid (AZ) adást követően, az AZ vazodilatátor hatása miatt az áramlási sebesség nőtt és a pulzatilitási index csökkent. Annak ellenére, hogy az AZ szignifikáns vazodilatációt okozott, a vizuális stimuláció további áramlási sebességfokozódáshoz és a pulzatilitási index csökkenéséhez vezetett a PCA ellátási területében a 15 mg/kg adagban alkalmazott AZ hatás maximuma idején. Ezek az eredmények azt jelezték, hogy a neuronális aktiváció hatására a vazodilatáció révén tovább csökkent a cerebrovaszkuláris rezisztencia a PCA ellátási területében, vagyis az AZ indukálta vazodilatáció nem gátolta a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges rezsizatenciaerek dilatációját. Adataink alapján az a következtetés vonható le, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat és az AZ okozta vazodilatáció feltehetően egymástól részben független, más útvonalon valósult meg, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolat során a regionális agyi véráramlás akkor is képes volt alkalmazkodni a metabolikus igényekhez, amikor egyéb vazodilatátor hatás már a rezisztenciaerek dilatációját előidézte. Kijelenthető továbbá, hogy az AZ 15 mg/kg adagban intravénásan alkalmazva nem okozott maximális cerebrális vazodilatációt, hisz a neuronális aktiváció további értágulatot eredményezett. Ezek az eredmények Gommer és mtsai. (2008) eredményeivel vannak összhangban, akik szintén azt találták, hogy az AZ a fenti adagban nem vált ki maximális agyi értágulatot. Vizsgálatunk felhívta a figyelmet arra, hogy bár az AZ vazoreaktivitási tesztekben az áramlási paraméterek változását nem a PCA-ban, hanem általában az MCA-ban vizsgálják, az AZ provokációs tesztek során fontos, hogy a vizsgálat nyugodt és standard körülmények között történjen, hisz neuronális aktivitáshoz vezető tényezők (hallás, gondolkodás, ujjmozgás...) módosíthatják a teszt eredményét.

Az AZ dózisa és maximális hatásának ideje

Az alkalmazott AZ adagot illetően megjegyzendő, hogy 5-18 mg/kg közötti adagban az AZ dózisfüggő módon hatott az agyi vérátáramlásra (Grossmann and Koeberle, 2000). A mellékhatásokat is figyelembe véve az AZ tesztekhez 13 mg/kg AZ használatát javasolták. Mások humán vizsgálatokban (Gommer és mtsai., 2008) és állatkísérletekben (Démolis és mtsai., 2000) azt találták, hogy az AZ 15 és 21 mg/kg adagban történő adása nem gátolta teljesen az autoregulációt, mely arra utalt, hogy nem okozott maximális vazodilatációt. Dahl és mtsai. (1995) szintén szignifikáns kapcsolatot találtak a TCD-vel mért MCA áramlási sebességfokozódás és az AZ adag és szérum koncentráció között, s azt a következtetést vonták le, hogy a maximális agyi vazodilatáció eléréséhez az alkalmazott AZ dózisnak feltehetően el kell érnie, illetve meg kell haladnia a 15 mg/kg dózist. Ezeket az adatokat figyelembe véve, a tanulmányunkban 15 mg/kg AZ adagot adtunk, hogy a súlyosabb mellékhatásokat elkerüljük, de szignifikáns AZ hatást érjünk el.

Egy másik kérdés volt a vizsgálati protokoll megtervezésekor, hogy mikorra időzítsük az AZ adás utáni fTCD vizsgálatot. Mivel korábbi kísérletekben az AZ hatásként jelentkező áramlási sebességváltozás 8-15 perccel a beadás után érte el a maximumát (Dahl és mtsai., 1995) és az a 10. és 20. perc között stabilan fennmaradt, az AZ hatás alatti vizuális stimuláció indukálta áramlási tesztet 10 perccel az AZ alkalmazása után indítottuk. Ez azt biztosította, hogy a 10 percig tartó második fTCD vizsgálatot pont az AZ hatás maximumának idején tudtuk elvégezni (**37. ábra**).

Az AZ és a neuronális aktiváció kiváltotta vazodilatáció lehetséges háttere

Eredményeink fő üzenete az volt, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat és az AZ indukálta vazodilatáció egymástól részben független módon valósul meg. Az AZ targetének számító karboanhidráz enzim a gliasejtekben, a plexus chorioideusban és az agyi kapillárisok endothelsejtjeinek a mebránjában talalható meg. A karoboanhidráz enzim a

 $CO_2+H_2O \rightarrow H_2CO_3$ átalakulást katalizálja, melynek gátlása során nő a CO_2 koncentráció, s ennek tulajdonítják az AZ vazodilatátor hatását, de a pontos molekuláris mechanizmus jelenleg sem ismert (Settakis et al, 2003).

A neurovaszkuláris kapcsolat háttere részleteiben szintén nem tisztázott, de az ismert, hogy a metabolikus tényezőkön túl a szinaptikus aktivitás is hozzájárul a neuronális aktiváció okozta áramlási válaszhoz. A szinaptikus aktivitás növeli az intracelluláris kalcium koncentrációt a közeli asztrocitákban, mely az asztrociták perivaszkuláris végződésein vazodilatátor molekulák (adenozin, NO, prosztaglandinok) szekréciójához vezet, s így növeli a lokális vérátáramlást (Jakovcevic és Harder, 2007; Iadecola és Nedergaard, 2007).

Mégha a végső végrehajtó sejt ugyanaz is (vaszkuláris simaizomsejt), a vazodilatátor hatáshoz vezető fentebb vázolt különböző útvonalak magyarázhatják az AZ hatás maximumán is megvalósuló további cerebrális vazodilatációt a neurovaszkuláris kapcsolat során. Eredményeink szerint ezek a mechanizmusok egymástól részben függetlenek, melyek azt biztosítják, hogy már meglévő vazodilatáció esetén is kialakulhasson a neurovaszkuláris kapcsolathoz szükséges vazodilatáció. Hozzánk hasonlóan, Azevedo és mtsai. (2007) sem találtak szignifikás eltérést a neuronális aktiváció indukálta áramlási válaszban különböző ortosztatikus reakciók és különböző vérnyomásértékek, vagyis különböző mikroér átmérők mellett, mely adatok a cerebrális autoraguláció és a neurovaszkuláris kapcsolat egymástól eltérő szabályozását jelzik.

Összefoglalás, következtetés

Eredményeink azt igazolták, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat akkor is jól működött, amikor az AZ közel maximális adagban alkalmazva már szignifikáns vazodilatációt okozott. A neurovaszkuláris kapcsolathoz szükséges vazodilatáció független szabályozása azt biztosítja, hogy a regionális agyi vérátáramlás akkor is tudjon alkalmazkodni az aktuális neuronális aktiváció támasztotta metabolikus igényekhez, amikor egyéb folyamat miatt az agyi mikroerek már kitágultak.

Klinikai és kutatási szempontból fontos, hogy az acetazolamid provokációs tesztek során a vizsgálat nyugodt és standard körülmények között történjen, hisz neuronális aktivitáshoz vezető tényezők módosíthatják a teszt eredményét.

5.2.2.2. A hipokapnia és NSAID készítmények kiváltotta vazokonstrikció hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

Más szerzők és mi is igazoltuk, hogy a szignifikáns cerebrális vazodilatáció nem befolyásolta lényegesen a neurovaszkuláris kapcsolatot (Rosengarten és mtsai., 2003c; Yonai és mtsai., 2010), legalábbis vizuális stimulus hatására mind a vazodilatítív stimulus alkalmazása előtt, mind azt követően hasonló mértékben nőtt a PCA áramlási sebesség. Köztudott, hogy a hipokapnia (alkalózis) cerebrális vazokonstrikciót hoz létre, emellett az NSAID-ok közé tartozó indometacin vazokonstrikciót kiváltó hatása is jól ismert. Mivel a neuronális aktiváció indukálta regionális vérátáramlás változáshoz ciklo-oxigenáz és nitrogénmonoxid-szintetáz szükséges (Girouard és Iadecola, 2006; Koehler és mtsai., 2006; Filosa és Blanco, 2007; Leithner és mtsai., 2010), többen vizsgálták, hogy a ciklo-oxigenázt gátló NSAID készítmények befolyásolják-e az agyi vazoreaktivitást. A legintenzívebben a nemszelektív NSAID-ok közé tartozó, potens vazokonstrikor hatással bíró indometacint vizsgálták, melyről kimutatták, hogy 20-40%-kal csökkentette az agyi vérátáramlást, gátolta a hiperkapnia és az acetazolamid indukálta vazokonstrikciót, csakúgy mint a neurovaszkuláris kapcsolatot (Pickard és MacKenzie, 1973; Sakabe és Siesjö, 1979; Gabrielian és mtsai., 1979; Pickard és mtsai., 1980; Hoffman és mtsai., 1982; Wennmalm és mtsai., 1981; Pickles és mtsai., 1984; Jensen és mtsai., 1993, Pickard és MacKenzie, 1973; Sakabe és Siesjö, 1979; Gabrielian és mtsai., 1979; St Lawrence és mtsai., 2002; Wang és mtsai., 1993; Wang és mtsai., 1999; Girouard és Iadecola, 2006; Filosa és Blanco, 2007; Csete és mtsai., 2001, Bruhn és mtsai., 2011). Számos tanulmány részletesen vizsgálta az NSAID-ok cerebrális erekre gyakorolt hatását állatokban (egér, patkány, sertés), nyitott ductus arteriosus-szal született újszülöttekben (Edwards és mtsai, 1990; Hammerman és mtsai., 1995; Christmann és mtsai., 2002; Kondo és mtsai., 2010), valamint fejsérülést szenvedett felnőttekben (Biestro és mtsai., 2005; Imberti és mtsai., 2005; Rasmussen, 2005; Puppo és mtsai., 2007), de meglehetősen kevés adat állt rendelkezésre az NSAID egészséges felnőttek agyi keringésére gyakorolt hatásáról (St Lawrence és mtsai., 2002, Jensen és mtsai., 1993; Bruhn és mtsai., 2011; Markus és mtsai., 1994). Emellett, amikor humán tanulmányokban vizsgálták az NSAID-ok cerebrális hemodinamikára gyakorolt hatását, az NSAID-ot intravénás bolus injekcióban, vagy infúzióban adták (Jensen és mtsai., 1993; St Lawrence és mtsai., 2002; Bruhn és mtsai., 2011; Hammerman és mtsai., 1995; Christmann és mtsai., 2002; Kondo és mtsai., 2010), szájon át (Markus és mtsai., 1994) vagy kúpban (Wennmalm és mtsai., 1981) történő alkalmazáskor pedig egyszeri nagy dózisban kapták a gyógyszert a vizsgálati alanyok (Rasmussen, 2005). A beadás módjának jelentőségére hívták fel a figyelmet azok az agyi keringést vizsgáló tanulmányok, melyek azt igazolták, hogy az indometacin lassú infúzióban történő adagolás esetén nem, vagy csak enyhébb hatást lehetett kimutatni, mint bolus injekcióban történő alkalmazáskor (Hammerman és mtsai., 1995; Christmann és mtsai., 2002; Kondo és mtsai., 2010; Biestro és mtsai., 1995). Tekintve, hogy az NSAID adás a mindennapi klinikai gyakorlatban többnyire szájon át történik, célunk a szokásos adagban orálisan adott, leggyakrabban alkalmazott NSAID-ok hatásának a vizsgálata volt. Mivel a neurovaszkuláris kapcsolathoz a rezisztenciaerek dilatációja szükséges, s az indometacinnak jól ismert a vazokonstriktor hatása, azt vizsgáltuk, hogy szokásos indometacin adag gátolja-e a neurovaszkulári kapcsolat kialakulását. Annak megválaszolására, hogy egyéb nem szelektív NSAID készítménynek eltérő hatása van-e a neurovaszkuláris kapcsolatra, egy másik gyakran használt készítmény, a naproxen hatását is megvizsgáltuk.

Tanulmányunkban tehát azt kívántuk vizsgálni, hogy különböző tényezők okozta vazokonstrikció számottevően befolyásolja-e a neurovaszkuláris kapcsolat működését. Ehhez normokapnia és hipokapnia során, valamint non-szetorid gyulladásgátlók (indometacin és naproxen) alkalmazása előtt és azt követően vizsgáltuk a vizuális stimulus indukálta áramlási sebességváltozást a PCA-ban, míg a neuronális aktivitás mértékét VEP vizsgálattal becsültük. Eredményeink azt igazolták, hogy mind az NSAID készítmények közé tartozó indometacin és naproxen, mind a hiperventiláció kiváltotta hipokapnia vazokonstrikciót váltott ki a cerebrális rezisztenciaerekben és szignifikánsan gátolta a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges vazodilatációt, miközben a neuronális aktiváció mértékét jelző kiváltott válasz paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés a kontroll fázishoz képest.

5.2.2.3. A nem-steroid gyulladásgátlók (indometacin és naproxen) neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatása

A ciklo-oxigenáz (COX) enzimet gátló, nem-steroid gyulladásgátló gyógyszerek közé tartozó naproxent és indometacint széles körben használjuk markáns fájdalomcsillapító hatásuk miatt. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy ezek a gyógyszerek terápiás dózisban, orálisan alkalmazva szignifikánsan csökkentették a látókérget ellátó arteria cerebri posteriorban (PCA) mérhető nyugalmi véráramlási sebességet, s növelték a pulzatilitási indexet, mely változások a cerebrális rezisztenciaerek vazokonstrikcióját jelezték. Mindezek mellett, mind az indometacin, mind a naproxen hatás alatt csökkent a vizuális stimulus kiváltotta véráramlási sebességváltozás a PCA-ban, miközben a látókéreg neuronális aktivációját jelző vizuális kiváltott válasz paramétereiben nem volt változás a kontroll fázishoz képest. Mivel a naproxen és indometacin cerebrális rezisztenciaerekre gyakorolt hatásai között nem észleltünk szignifikáns különbséget, eredményeink azt jelezték, hogy nemcsak az indometacin, hanem egyéb nem-steroid gyulladásgátló gyógyszer, mint pl. a naproxen is képes a neurovaszkuláris kapcsolatot gátolni. Tudomásunk szerint ez volt az első olyan transzkraniális Doppler tanulmány, mely igazolta a nem-steroid gyulladásgátlók neurovaszkuláris kapcsolatra kifejtett gátló hatását.

Különböző nem-steroid gyulladásgátlók cerebrális hemodinamikára gyakorolt hatása

Bár számos nem-steroid gyulladásgátló ismert, a legtöbb cerebrális hemodinamikával foglalkozó tanulmányban az indometacin hatását vizsgálták. Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy az indometacin egy jól ismert, erős vazokonstriktor hatással bíró szer, melyről kimutatták, hogy a bazális agyi véráramlást kb. 20-40%-al csökkentette (Pickard és MacKenzie, 1973; Sakabe és Siesjö, 1979; Gabrielian és mtsai., 1979; Pickard és mtsai., 1980; Hoffman és mtsai., 1982; Wennmalm és mtsai., 1981; Pickles és mtsai., 1984; Jensen és mtsai., 1993, Pickard és MacKenzie, 1973; Sakabe és Siesjö, 1979; Gabrielian és mtsai., 1979; St Lawrence és mtsai., 2002). Az indometacin markáns vazokonstriktor hatását a klinikai gyakorlatban többek között traumás agyállomány vérzésben az intrakraniális nyomásfokozódás csökkentésére (Biestro és mtsai., 2005; Imberti és mtsai., 2005; Rasmussen, 2005; Puppo és mtsai., 2007), valamint újszülötteknél a ductus arteriosus persistens zárására is felhasználták (Edwards és mtsai, 1990; Hammerman és mtsai., 1995; Christmann és mtsai., 2002; Kondo és mtsai., 2010). Az indometacintól eltérően, egyéb NSAID készítmények vazoaktív hatásának a vizsgálatakor nem, vagy nem mindig tudtak cerebrális vazokonstrikciót kimutatni. Az ibuprofen például állatkísérletek során nem csökkentette az agyi vérátáramlást (Pellicer és mtsai., 1999), és az indometacinnal ellentétben sem az ibuprofen (Wang és mtsai., 1993), sem a diclofenac (Pellicer és mtsai., 1999; Wagerle és mtsai., 1994) nem gátolta a széndioxid reaktivitást. Bár nagy-dózisú, intravénásan adott aszpirin nyulakban csökkentette az agyi véráramlást (Bednar és Gross, 1999), a humán vizsgálatok során 500-1200 mg adagban alkalmazott aszpirin esetében ezt a hatást nem tudták kimutatni, s ez az aszpirin adag a széndioxid reaktivitást illetve a neurovaszkuláris kapcsolatot sem befolyásolta (Markus és mtsai., 1994; Bruhn és mtsai., 2011).

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a naproxen és indometacin hatására a nyugalmi cerebrális véráramlási sebesség csökkent és a pulzatilitási index emelkedett, mely változások mindkét NSAID csoportba tartozó szer cerebrális rezisztenciaerekre gyakorolt vazokonstrikciós hatását jelezték. Más szerzőkkel (Wennmalm és mtsai., 1984; Chemtob és mtsai., 1991) ellentétben eredményeink azt jelezték, hogy az indometacinon túl egyéb NSAID készítménynek, nevezetesen a naproxennek is van a cerebrális rezisztenciaerekre gyakorolt érszűkítő hatása.

Módszertani kérdések

Az agyi vérátáramlás és az agyi véráramlási sebesség kapcsolatát illetően tett megállapítás, miszerint ugyanazon személyben a véráramlási sebesség változása az intrakraniális nagyartériákban arányos az adott arteria ellátási területében mérhető egyidejű agyi vérátáramlás változással csak akkor állja meg a helyét, ha az inszonált ér átmérője nem változik azokra a stimulusokra, amelyek érintik a cerebrális mikrokeringést (Rasulo és mtsai., 2008). Esetünkben, az NSAID szerek adása után a PCA áramlási sebesség szignifikáns csökkenéséből és a pulzatilitási index emelkedéséből a PCA ellátási területében lévő rezisztenciaerek vazokonstrikciójára és csökkent agyi vérátáramlásra következtettünk. Elméletileg azonban lehetséges, hogy az indometacin vagy naproxen nemcsak a rezisztenciaereket szűkítette, hanem a nagy intrakraniális ereket, beleértve a PCA-t is. Ebben az esetben a PCA-ban mérhető áramlási sebesség nettó változása a PCA csökkent érátmérőjének és a rezisztenciaerek vazokonstrikciójának együttes hatásából származott volna. Ha azonban az indometacin és a naproxen csökkentette volna a PCA átmérőjét, ez a PCA-ban mérhető véráramlási sebesség növekedéséhez járult volna hozzá. Mivel vizsgálataink a naproxen és indometacin beadása után a PCA véráramlási sebességének a szignifikáns csökkenését, nem pedig növekedését igazolták, ezt csak a rezisztenciaerek markáns vazokonstrikciójával lehet magyarázni, melynek mértéke meghaladta a PCA esetleges átmérő csökkenéséből származó véráramlási sebességet befolyásoló hatást. Ezért a PCA átmérőjének egy esetleges csökkenése nem befolyásolta volna a következtetésünket, mivel a PCA-ban mérhető véráramlási sebesség csökkenése mindenképp csökkent regionális agyi véráramlást jelzett, függetlenül attól, hogy az indometacin vagy naproxen a PCA átmérőjét szűkítette-e.

Nem-steroid gyulladásgátlók hatása a neurovaszkuláris kapcsolatra

A nyugalmi véráramlás csökkentése mellett kimutatták, hogy az indometacin gátolja a vazodilatációval járó folyamatokat, beleértve a hiperkarbia és acetazolamid indukálta cerebrális vazoreaktivitást is (Wang és mtsai., 1993; Csete és mtsai., 2001). Az is ismert állatkísérletekből, hogy mind az NO-szintáz, mind a COX enzim gátlása jelentősen csökkenti a neuronális aktiváció indukálta áramlásnövekedést, jelezve, hogy az NO mellett a prosztanoidok is fontos szerepet játszanak a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásában (Leithner és mtsai., 2010; Niwa és mtsai., 2001; Niwa és mtsai., 2000; Jakovcevic és mtsai., 2007; Bakalova és mtsai., 2002; Stefanovic és mtsai., 2006; Matsuura és mtsai., 2009). Állatkísérletek mellett, egy humán tanulmány is bizonyította, hogy a prosztaglandin szintézist gátló indometacin a funkcionális agyi aktiváció során csökkentette a vazodilatatív választ (Bruhn és mtsai., 2011). Ebben a tanulmányban funkcionális MRI vizsgálatokat végeztek

egészséges önkéntesekben intravénás indometacin vagy acetil-szalicilát beadása előtt és után, és BOLD MRI-vel vizsgálták az occipitalis kéreg működését vizuális stimuláció alatt. Míg az indometacin jelentősen gátolta a neuronális aktivációt, addig az acetil-szalicilátnak nem volt hasonló hatása. Összhangban ezzel a megfigyeléssel, fTCD vizsgálataink is igazolták az indometacin neurovaszkuláris kapcsolatot gátló hatását. Eredményeink azonban arra utaltak, hogy az indometacin mellett a naproxen is vazokonstriktor hatással bírt, s nemcsak az agyi véráramlási sebességet csökkentette, hanem az agykérgi aktiváció indukálta áramlási választ is gátolta. Vizsgálataink azt is bizonyították, hogy az indometacin és naproxen fent említett hatásai nemcsak kísérleti körülmények között, hanem a mindennapi klinikai gyakorlatban, a gyógyszerek szokásos, terápiás dózisban történő alkalmazása esetén is megfigyelhető volt. A géntechnológia fejlődése és a szelektív COX inhibitorok megjelenése lehetővé tették annak vizsgálatát, hogy mely COX izotípusok lehetnek felelősek a neurovaszkuláris kapcsolatért. Azok a megfigyelések, melyek szerint COX1 deficiens egerek szomatoszenzoros kérgében, a szenzoros stimuláció hatására a véráramlás szignifikánsan növekedett (Niwa és mtsai., 2001), de a COX2 izoenzim szelektív gátlása után az áramlás változás mértéke csökkent (Niwa és mtsai., 2000), a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásában a COX2 elsődleges szerepét hangsúlyozták. Ezekkel az eredményekkel összhangban, megfigyelték azt is, hogy a COX2 izoenzimet gátló meloxicam intravénás alkalmazása patkányokban csökkentette a neuronális aktiváció által kiváltott cerebrális vérátáramlás növekedést és a BOLD választ (Stefanovic és mtsai., 2006). Ugyanakkor egy funkcionális near-infrared spektroszkópiás humán vizsgálat adatai szerint a COX-1 genotípus-(L237M, rs5789)-függő enzimfunkció csökkenése heterozigóta L/M hordozókban együtt járt a vizuális stimuláció kiváltotta hemodinamikai válasz 42% -os csökkenésével, mely azt sugallta, hogy a COX2 mellett a COX1 izoenzim is modulálta a neurovaszkuláris kapcsolatot (Hahn és mtsai., 2011).

A hipokapnia indukálta vazokonstrikció neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatása

A bevezetésben ismertettük, hogy a vér parciális szén-dioxid nyomásának (pCO₂) emelkedése (hiperkapnia) és a pH csökkenése vazodilatációt, míg a pCO₂ szint csökkenése és a pH növekedése vazokonstrikciót eredményez.

Eredményeink azt bizonyították, hogy annak ellenére, hogy a vizuális kiváltott válasz paraméterei nem változtak számottevően, a vizuális stimulációval kiváltott PCA-ban mért relatív áramlási sebességváltozás szignifikánsan alacsonyabb volt hiperventiláció alatt, mint normoventiláció során. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy bár a neuronális aktiváció mértéke nem változott, a kérgi aktiváció által kiváltott lokális vazodilatáció a hipokapnia okozta vazokonstrikció idején nem tudott teljes mértékben kialakulni. Tudomásunk szerint ez volt az első olyan humán tanulmány, amely azt bizonyította, hogy a hipokapnia indukálta vazokonstrikció szignifikánsan gátolta a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását. **Mivel a hipokapnia befolyásolta az áramlási sebességet és a kérgi neuronális aktivitás következtében kialakuló véráramlás változás mértékét, eredményeink arra is felhívták a figyelmet, hogy dinamikus cerebrális áramlási vizsgálatok során standard kísérleti feltételek, ezen belül állandó légzésszám és pCO₂ biztosítása szükséges (Debreczeni és mtsai., 2009).**

Hipokapnia hatása a neuronális aktiváció kiváltotta véráramlás változásra, s az eredmények klinikai jelentősége

Mivel hipokapnia során a cerebrális rezisztenciaerek szűkületének következtében jelentősen csökkent az áramlási sebesség, nem meglepő, hogy az abszolút áramlási sebességek tekintetében a változások is sokkal kisebbek voltak hiperventiláció során, mint normoventilációkor. Ezért ahhoz, hogy az áramlási sebességek változását a normo- és hiperventilációs fázisban egymással összehasonlíthassuk, az abszolút sebességértékekből relatív áramlási sebességeket számoltunk.

Bár a vizuális stimuláció következtében mindkét fázisban nőtt a relatív áramlási sebesség, ez szignifikánsan alacsonyabb volt hiperventiláció (hipokapnia) alatt mint normoventiláció (normokapnia) során, jelezve, hogy a hipokapnia kiváltotta vazokonstrikció szignifikánsan gátolta az agykérgi neuronális aktiváció következtében kialakuló véráramlási változásokat (42. ábra). Míg a vizuális stimuláció kiváltotta maximális relatív véráramlási válasz a hiperventiláció alatt ($12 \pm 5\%$) kevesebb, mint a fele volt a kontroll fázisban mért értéknek (26 ± 7%), a vizuális kiváltott potenciálok paraméterei nem változtak jelentősen (12. táblázat). Mindez a neurovaszkuláris kapcsolat gátlása mellett azt is jelezte, hogy a fiziológiás vérátáramlás növekedés mintegy fele is elegendő ahhoz, hogy a vizuális stimuláció során a neuronális működés még ép maradjon. Eredményeink összhangban vannak mások megfigyeléseivel (Fox és mtsai., 1988; Lin és mtsai., 2008), melyek szerint a neuronális akiváció okozta cerebrális vérátáramlás növekedés mértéke 2-10-szeres ahhoz képest, mint ami a megnövekedett agyi oxigén anyagcseréhez szükséges a kérgi aktiváció során. Ezek az eredmények azt jelezték, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat jelentős biztonsági tartalékokkal működik fiziológiás feltételek között. Ennek ellenére, a szignifikáns pCO2 csökkenés és az alkalózis neuronális funkcióra gyakorolt potenciális káros hatása patológiás körülmények között nem hagyható figyelmen kívül. Zárt koponyasérült betegekben például igazolták, hogy a hiperventiláció a vazokonstrikció révén ischaemiás károsodást indukálhat (Coles és mtsai., 2007). Ezért azokban a betegségekben, melyek az oxigenizáció zavarával, vagy a vérátáramlás csökkenésével járhatnak, számolnunk kell a hiperventiláció és a következményes hipokapnia lehetséges kedvezőtlen hatásaival.

Azt a megfigyelést, miszerint a kérgi akiváció okozta áramlási válasz többszöröse annak, mint ami a megnövekedett agyi oxigén anyagcseréhez szükséges (Fox és mtsai., 1988; Lin és mtsai., 2008) magyarázhatja az az újabb teória, miszerint a neuronális aktivitás kezdetén a glükolízis biztosítaná az energiát a sejtek számára (Sándor, 2015). Márpedig a glükolízis nem igényel oxigént, viszont sokkal több glükózra van szükség egységnyi ATP előállításához, mint az oxidatív foszforiláció során. Ez a feltételezés már magyarázhatná a nagymérvű áramlásfokozódást, mely így nem a fokozott oxigén igény, hanem a fokozott glükóz szükséglet kielégítését lenne hivatott fedezni. Ezt az elképzelést támogatja az a tény is, hogy a fokozott agyi aktivitás kiváltotta anyagcsereváltozás és a regionális agyi véráramlás fokozódás meglehetősen kismértékű O₂ fogyasztással társul, ugyanakkor jól korrelál a szöveti glükóz-felhasználással (Edvinsson és Krause, 2002).

Az agyi mikroerek vazokonstrikciója és a gátolt neurovaszkuláris kapcsolat

Ellentétben a hiperkapnia vagy acetazolamid okozta értágulattal, mely nem befolyásolta a neurovaszkuláris kapcsolatot, **a hipokapnia kiváltotta érszűkület**

szignifikánsan gátolta a neuronális aktivitás kiváltotta véráramlási választ. A

tanulmányunk adatai alapján azt nem lehet megválaszolni, hogy a vazokonstrikció, függetlenül annak okától, általában gátolja-e a neurovaszkuláris kapcsolatot, mint ahogy az is kérdéses, hogy a hipokapnia csak a vazokonstrikciót kiváltó hatásával rontja a vaszkuláris választ, vagy van egyéb hatása is a neuronális aktiváció okozta véráramlás változásra.

Összefoglalás, következtetés

Mind a hiperventiláció kiváltotta hipokapnia, mind a mindennapi gyakorlatban, terápiás dózisban alkalmazott nem szelektív COX inhibitorok vazokostrikciót okoztak az agyi rezisztenciaerekben és szignifikánsan gátolták a neuronális aktiviáció által kiváltott véráramlási választ, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolatot. A hipokapnia hatását vizsgáló tanulmányunk arra is rámutatott, hogy a fiziológiás vérátáramlás növekedés mintegy fele is elegendő ahhoz, hogy a vizuális stimuláció során a neuronális működés még ép maradjon, vagyis a neurovaszkuláris kapcsolat jelentős tartalékokkal rendelkezik.

A klinikai gyakorlatban fontos szem előtt tartani, hogy a hiperventiláció és az NSAID készítmények alkalmazása az agyi mikroerek vazodilatációjának a gátlásán és a vazokonstrikció kiváltásán keresztül fokozhatja a kedvezőtlen klinikai kimenetel rizikóját azokban az állapotokban, melyek az oxigenizáció zavarával és az agyi véráramlás csökkenésével (hipoxia, agyi ischaemia), vagy fokozott oxigénigénnyel (status epilepticus) járnak (Coles és mtsai., 2007). Ezekben az esetekben ugyanis a hipokapnia és az NSAID-ok a megfelelő vérellátást biztosító, vazodilatációt igénylő kompenzatorikus folyamatok gátlásával az oxigén ellátás és igény közötti felborult egyensúlyt tovább ronthatják, fokozva ezzel a cerebrális hipoxia veszélyét (Mirro és mtsai., 1988). Mivel a hiperventiláció befolyásolja az agyi véráramlást, dinamikus cerebrális áramlási vizsgálatok során fokozott figyelmet kell fordítani a standard kísérleti feltételek megteremtéséhez, ezen belül az állandó légzésszám és pCO₂ biztosításához.

5.2.3. Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza nyomtatott szöveg, illetve Braille írás olvasásának a hatására

Az utóbbi három évtizedben funkcionális MRI és PET vizsgálatok a látókéreg aktivációját igazolták vak személyekben Braille-olvasás során (Gizewski és mtsai., 2003; Sadato és mtsai., 1996; Burton és mtsai., 2002; Sadato és mtsai., 1998; Büchel és mtsai., 1998), valamint különböző tapintáson alapuló megkülönböztetési feladatok végzésekor (Sadato és mtsai., 2002; Sadato és mtsai., 2004; Wanet Defolque és mtsai., 1988; Uhl és mtsai., 1993; Burton és mtsai., 2006).

Míg a vizuális inger (fénystimulus, nyomtatott szöveg olvasása, sakktábla stimuláció) kiváltotta, az a. cerebri posteriorban mérhető abszolút vagy relatív áramlásnövekedés mértékéről számos közlés található a tudományos irodalomban (Sturzenegger és mtsai., 1996; Talagala és mtsai., 1998; Kim és mtsai., 1999; Pánczél és mtsai., 1999; Ito és mtsai., 2001; Rosengarten és mtsai., 2006; Gu és mtsai., 2006; Oláh és mtsai., 2008; Lin és mtsai., 2009; Boms és mtsai., 2010; Lin és mtsai., 2010, Lin és mtsai., 2011a, Szabó és mtsai., 2014), addig a vak személyek Braille-olvasása során mérhető a. cerebri posterior (PCA) áramlásváltozásáról csak kevés hasonló leírás áll rendelkezésre (Sadato és mtsai., 1996; Sadato és mtsai., 1998). Ennek hátterében az áll, hogy vakokban a tapintási inger által aktivált régiók abszolút vagy relatív áramlásváltozása helyett a PET és fMRI tanulmányokban statisztikai parametrikus térképeken igazolták az aktiváció szignifikáns voltát (Gizewski és mtsai., 2003; Burton és mtsai., 2002; Sadato és mtsai., 1996). Ez ugyan megfelelő statisztikai módszer, de nem szolgáltat információt az aktiváció eredményeképpen létrejött áramlásnövekedés mértékéről és dinamikájáról. Megjegyzendő továbbá, hogy a korábbi PET és fMRI tanulmányokban a Braille-olvasásnak az occipitalis kéreg aktivációjára kifejtett hatását a szabad folyamatos olvasástól eltérő módszerekkel (mint például szavak megkülönböztetése /Sadato és mtsai., 1996; Sadato és mtsai., 2002/) vizsgálták.

Tanulmányunkban a folyamatos olvasás okozta occipitalis kérgi aktiváció hatására bekövetkező PCA áramlásváltozást vizsgáltuk vak és látó személyekben TCD segítségével. Mivel az elsődleges és másodlagos látókérget csaknem kizárólag a PCA látja el, az ezen arteriában létrejövő véráramlási sebességváltozás jól tükrözi a PCA által ellátott régió vérátáramlásának változását. A szegényes térbeli felbontás ellenére a TCD kiváló időbeli felbontással bír, lehetővé téve az áramlási paraméterek beat-to-beat mérését és ezáltal az áramlásváltozás mértékének és dinamikájának meghatározását.

Vizsgálatainkkal arra kerestünk választ, hogy milyen a PCA-ban mérhető áramlásváltozás mértéke látókban nyomtatott szöveg olvasásakor és vakokban Braille-olvasás során. Hogy megválaszoljuk ezeket a kérdéseket, két kísérleti protokollt alkalmaztunk mind a látó, mind a vak csoportban. A "Nyugalom-Olvasás" protokoll során a stimulációs fázisban (Olvasás) mért sebességeket a "Nyugalom" fázishoz viszonyítottuk, amikor az önkéntesek becsukott szemmel ültek. Ezzel szemben az "NLC-Olvasás" protokoll alkalmazásakor az olvasás alatt mért sebességértékeket az "NLC" fázishoz hasonlítottuk, amikor a résztvevők nem lexikális karaktereket néztek (látók), vagy tapintottak (vakok).

Eredményeink megerősítették, azt a korábbi fMRI és PET tanulmányokból ismert tényt, hogy a látókéreg aktivációja nemcsak látókban és nemcsak vizuális inger hatására jön létre, de vakokban megfelelő szenzoros stimulus (Braille olvasás) esetén is kimutatható. Tanulmányunkban a két különböző kísérleti protokoll használata lehetővé tette, hogy külön megvizsgáljuk a betű- és szófelismerés, vagyis a szorosan értelmezett olvasás (NLC-Olvasás protokoll) és a fényinger + betű- és szófelismerés (Nyugalom-Olvasás protokoll) hatását a PCA áramlási sebességváltozásra látókban, illetve külön meghatározzuk a betű- és szófelismerés (NLC-Olvasás protokoll) és a kéz/ujjmozgás + betű- és szófelismerés (Nyugalom-Olvasás protokoll) hatását vakokban. Eredményeink azt igazolták, hogy amikor a "Nyugalom" fázisban mért PCA áramlási sebességhez viszonyítottuk az olvasáskor mért áramlási sebességet, vagyis amikor látókban a fényinger + betű- és szófelismerés, vakokban pedig a kéz/ujjmozgás + betű- és szófelismerés hatását vizsgáltuk, az olvasás a látó személyekben szignifikánsan nagyobb áramlási sebességnövekedést indukált ($25.9 \pm 6.9\%$) a PCA-ban, mint a Braille-olvasás a korai vak önkéntesekben ($10.0 \pm 5.0\%$). Ezzel szemben, amikor a látó és a korai vak alanyokban az "NLC" fázisban detektált PCA áramlási sebességet tekintettük alapértéknek, vagyis amikor a stimulációs fázisban csak a betű- és szófelismerés

volt az új inger, akkor a PCA-ban mérhető áramlási sebességváltozás hasonló volt a látó (8.1 \pm 3.5%) és a Braille-írást olvasó vak személyekben (10.5 \pm 4.5%). Ezek az adatok azt mutatták, hogy míg olvasáskor önmagában a betű- és szófelismerés mintegy 8-10%-os áramlási sebességnövekedést okozott az occipitalis kérget ellátó artériában mind a korai vak, mind a látó önkéntesekben, addig a fényinger + betű- és szófelismerés együtt kb. háromszor akkora, vagyis kb. 26% áramlásnövekedést indukált a PCA-ban a látó csoportban. Eredményeink tehát azt sugallták, hogy látókban az olvasás hatására a PCA-ban bekövetkező áramlásnövekedés kétharmad részét az olvasáshoz szükséges fénystimulus okozta, míg a betűés szófelismerésnek, vagyis a szorosan értelmezett olvasásnak csak az áramlásváltozás egyharmada volt köszönhető. Mivel vakokban a fénystimulus nem befolyásolta az áramlásnövekedést a PCA-ban, ebben a csoportban önmagában a betű- és szófelismerés volt a felelős a PCA-ban létrejött áramlásváltozásért. Tekintve, hogy a vakokban mind a betűfelismerés, mind a kéz/ujjmozgás + betűfelismerés hasonló aktivációt okozott, kijelenthető, hogy a Braille írás olvasásához szükséges kéz/ujjmozgás nem volt hatással a látókérget ellátó PCA áramlásra. Az a tény, hogy önmagában a betű- és szófelismerés mindkét csoportban hasonló mértékű és dinamikájú áramlásváltozást indukált a PCAban azt jelezte, hogy látókban a vizuális és vakokban a tapintási stimulus alapján történő betű- és szófelismerés önmagában hasonló occipitalis kérgi aktivációt eredményezett. Ez alapján hasonló mechanizmus tételezhető fel a betű- és szófelismerés hátterében vakokban Braille írás és látókban nyomtatott szöveg olvasása során.

A kiindulási, nyugalmi áramlási sebességértékek látókban és vakokban

Vizsgálataink azt igazolták, hogy a kiindulási áramlási sebesség szignifikánsan alacsonyabb volt a vak önkéntesekben a látókhoz viszonyítva. Mivel azok a paraméterek, amelyek befolyásolhatják a véráramlás és a véráramlási sebesség közötti kapcsolatot (artériák átmérője, vér viszkozitás, arteriolák rezisztenciája, perfúziós nyomás) egyénileg változhatnak, a különböző alanyok ugyanazon artériáiban mért abszolút áramlási sebességek nem feltétlenül arányosak az adott agyi artéria által ellátott terület vérátáramlásával. Adataink alapján a vérnyomásértékek nem különböztek a vak és a látó csoportokban, s bár a viszkozitást nem mértük, szignifikáns különbség ebben a paraméterben sem volt valószínű. Egy esetlegesen nagyobb PCA átmérő magyarázhatta volna az alacsonyabb áramlási sebességet a vak vizsgálati alanyokban, de ez szintén valószínűtlen volt. Összegzésként megjegyzendő, hogy bár az alacsonyabb abszolút áramlási sebességek a vak egyének PCA-jában nem szükségszerűen jelentettek alacsonyabb agyi véráramlást a PCA ellátási területében a látókhoz képest, az ilyen szignifikáns és konzekvens különbség mégis azt valószínűsítette, hogy a kisebb PCA áramlási sebesség hátterében alacsonyabb PCA véráramlás állt a vak személyekben.

A fenti megfigyelésünket magyarázhatják azok az állatkísérletes hisztológiai/mikroszkópos tanulmányok (Bourgeois és Rakic, 1996; Dehay és mtsai., 1989) melyek az elsődleges látókéreg területének (Brodmann 17 area) kifejezett csökkenéséről tettek említést miután a perifériás inputot prenatalis enucleatio által gátolták. Ugyancsak az alacsonyabb occipitalis vérátáramlást magyarázhatja korai vakokban az a PET tanulmány, melyben Büchel és mtsai. (1998) veleszületett vak személyekben Braille-olvasás vizsgálata során nem találtak aktivációt az elsődleges látókéregben csak az asszociációs areákban, ezzel szemben a látó és késői vak személyekben nyomtatott vagy Braille-szöveg olvasásakor szignifikáns aktivációt mutattak ki a Brodmann 17 areában is. Ezek az eredmények választ adhatnak arra a kérdésre, miért volt a korai vakokban kisebb a PCA áramlási sebesség, mint a látókban. Ugyanakkor, ellentétben a TCD adatainkkal, PET tanulmányokban De Volder és mtsai. (1997) illetve Mishina és mtsai. (2003) magasabb nyugalmi relatív CBF (viszonyítva a teljes agyi CBF-hoz) értéket mértek vakok occipitalis kérgének néhány területén, összehasonlítva a látó személyek occipitalis kérgének relatív CBF értékével. Meg kell azonban említeni, hogy a relatív adatokkal ellentétben az abszolút CBF értékek magasabbak voltak az összes kérgi területben – beleértve a látókérget is – a látókban, mint a vakokban (De Volder és mtsai., 1997). A fenti ellentmondó adatokat további vizsgálatokkal, nevezetesen a nyugalmi, látókéregben mért CBF értékek meghatározásával lehetne tisztázni.

Olvasás indukálta PCA áramlásváltozás

Az olvasás, mint komplex feladat, két részre osztható. Egyrészről az olvasó személy felismeri és megkülönbözteti a különböző betűket és szavakat és megérti a szöveg tartalmát, másrészről látókban a nyomtatott szöveg olvasásához szükségszerűen fénystimulus is társul, vakokban pedig a kéz/ujjmozgás és tapintás a Braille-olvasás elengedhetetlen feltétele. Ahhoz, hogy ezeket a feladatokat elkülönítsük, két kísérleti elrendezést használtunk mind a látó, mind a vak önkéntesek vizsgálatakor. A "Nyugalom-Olvasás" protokoll során a látó személyeknek a fénystimulus + betű- és szófelismerés, a vak személyeknek a kéz/ujjmozgás + betű- és szófelismerés volt az új feladat a stimulációs fázis során a nyugalmi fázishoz viszonyítva. Ezzel szemben az "NLC-Olvasás" kísérleti elrendezésben mindkét csoportban csak a betű- és szófelismerés, vagyis a szorosabb értelemben vett olvasás volt az új inger a stimulációs periódusban az NLC fázishoz képest. Ezen protokollok használata lehetővé tette számunkra, hogy külön vizsgálhassuk a "fénystimulus + nyomtatott szöveg olvasása" és a "csak nyomtatott szöveg olvasása" hatását látó, valamint a "kéz/ujjmozgás + Braille-olvasás" és a "csak Braille-olvasás" hatását vak alanyokban. Adataink azt mutatták, hogy látókban a betű- és szófelismerés önmagában ("csak Braille olvasás") mintegy 8%-kal növelte az áramlást a PCA-ban az "NLC-Olvasás" protokoll alatt, míg a komplex fény + olvasási stimulus közel 26%-os áramlásváltozást eredményezett a "Nyugalom-Olvasás" protokoll során. Ezek az adatok azt jelezték, hogy a nyomtatott szöveg olvasása során az áramlásnövekedés legalább kétharmadáért a fénystimulus volt a felelős látókban és a PCA áramlásnövekedésnek csak egyharmada volt visszavezethető önmagában a betű- és szófelismerés hatására. Érdekes módon, ez azt is jelentette, hogy az egyszerű fénystimulus sokkal erőteljesebb aktivációt okozott az occipitalis kéregben, mint a bonyolultabb betű- és szófelismerés fénystimulus nélkül.

Vakokban a PCA áramlásváltozása hozzávetőlegesen 10% volt mindkét protokoll során. Látó személyekben hasonló áramlásnövekedés volt észlelhető, amikor csak a betű- és szófelismerés, vagyis a szorosan értelmezett olvasás hatását értékeltük. Ezek az adatok arra engedtek következtetni, hogy a betű- és szófelismerés indukálta occipitalis kérgi aktiváció hatására kialakuló áramlási válasz intenzitása hasonló volt a vak és a látó alanyokban. A két csoport között a "Nyugalom-Olvasás protokoll" során tapasztalt különbségnek az volt az oka, hogy a fénystimulus hatása hiányzott a vak személyekben.

Adatainkkal egybehangzóan, tudományos beszámolók szerint a vizuális inger 15-65%os relatív áramlásnövekedést okoz látó alanyokban (Sturzenegger és mtsai., 1996; Talagala és mtsai., 1998; Kim és mtsai., 1999; Ito és mtsai., 2001; Rosengarten és mtsai., 2006; Gu és mtsai., 2006; Oláh és mtsai., 2008; Lin és mtsai., 2009; Boms és mtsai., 2010; Lin és mtsai., 2010, Lin és mtsai., 2011, Szabó és mtsai., 2014), a kísérleti protokolloktól (a vizuális stimuláció frekvenciája, a vizuális minta összetettsége és kontrasztja, valamint a stimuláció folyamatos vagy intermittáló jellege) és a vizsgálati módszerektől (PET, funkcionális MRI, funkcionális TCD) függően. Ugyanakkor sajnálatosan kevés cikk érhető el a tudományos irodalomban a vak személyek occipitalis kérgében illetve a PCA-ban létrejött, Braille-olvasás által kiváltott abszolút vagy relatív áramlásnövekedés intenzitásáról (Sadato és mtsai., 1996; Sadato és mtsai., 1998). PET használatával Sadato és mtsai. (Sadato és mtsai., 1998) Brailleolvasás során 7%, 10,3% és 8,8% relatív áramlásnövekedést találtak a Brodmann 17, 18 és 19-es areában. Míg a mi tanulmányunkban a résztvevők folyamatosan olvastak, addig Sadato vizsgálatában a vak személyeknek szavakat és lexikális karaktereket kellett megkülönböztetniük olvasási feladatként. A kísérleti elrendezés és a vizsgálati módszerek különbözőségei ellenére (PET vs. TCD), a PET-tel mért áramlásnövekedés hasonló volt a mi TCD-vel mért adatainkhoz.

Összefoglalás, következtetés

TCD tanulmányunk megerősítette, hogy a Braille-olvasás aktiválta az occipitalis kérget vak résztvevőkben, áramlási sebességnövekedést eredményezve a PCA-ban. Az önmagában a betű- és szófelismerés által okozott áramlásváltozás intenzitása és dinamikája a PCA-ban hasonló volt vak és látó alanyokban Braille-olvasás illetve nyomtatott szöveg olvasása során, mely azt jelezte, hogy az occipitalis kérgi aktiváció mértéke közel azonos volt vak és látó egyénekben. A két különböző kísérleti elrendezés használatával ki tudtuk mutatni, hogy látókban az olvasás, mint komplex stimulus által kiváltott PCA áramlásnövekedés mintegy kétharmada a fénystimulusnak volt köszönhető, és a változásnak csak egyharmadát okozta önmagában a betű- és szófelismerés, vagyis a szorosan értelmezett olvasás.

Megfigyeléseink a vakokban agyi károsodás során bekövetkező tünetek jobb megértését segíthetik, illetve eredményeink a kognitív rehabilitáció/plaszticitás területén hasznosíthatók, nevezetesen, részleges occipitalis károsodás okozta látászavar esetén az occipitalis kéreg még épen maradt területe aktiválható taktilis stimulus útján, dombornyomott minták és betűk használatával.

5.2.4. Humán tanulmányaink eredményeinek az összefoglalása

Humán tanulmányaink igazolták, hogy a vaszkuláris rizikófaktorok közül az akut alkoholbevitel már 1 ‰ alatti alkohol koncentrációnál gátolja a vazomotor reflexet és az agyi autoregulációt, s így hozzájárulhat az ortosztatikus tolerancia csökkenéséhez és a stroke kockázat növekedéséhez. Fiatal dohányosokban kimutattuk, hogy a dohányzás gátolja a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását és a hiperkarbia kiváltotta vazodilatációt. Eredményeik azt is jelezték, hogy a dohányzás elhagyása után még fél-másfél évvel is rosszabb a neurovaszkuláris kapcsolat és az apnoe teszt kiváltotta vazoreaktivitás, mely a dohányzás agyi érrendszerre kifejtett hosszútávú negatív hatására utal. Ugyanakkor, kedvező tendenciaként a vizuális stimuláció idején mért maximális áramlási sebességfokozódás már jobb volt a dohányzást elhagyókban a dohányosokhoz képest. Eredményeink rámutatnak, hogy dohányosokban a károsodott vazoreaktivitás hozzájárulhat a stroke rizikó növekedéséhez és ronthatja az ischaemiás stroke kimenetelét.

Az agyi rezisztenciaerek átmérőjét befolyásoló tényezők közül a szignifikáns vazodilatációt okozó acetazolamid nem befolyásolta számottevően a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását, míg a vazokonstrikciót okozó hipokapnia és az orálisan, a terápiás dózisban alkalmazott nem szelektív NSAID szerek a neuronális aktiváció kiváltotta áramlási választ szignifikánsan mérsékelték. A klinikai gyakorlatban fontos szem előtt tartani, hogy a hiperventiláció és az NSAID készítmények alkalmazása az agyi vazodilatáció gátlása és a vazokonstrikció révén fokozhatja a kedvezőtlen klinikai kimenetel rizikóját azokban az állapotokban, melyek az oxigenizáció zavarával és az agyi véráramlás csökkenésével, vagy fokozott oxigénigénnyel járnak.

Mind klinikai, mind kutatási szempontból fontosnak tartjuk hangsúlyozni, hogy az acetazolamid provokációs tesztek során a vizsgálatoknak nyugodt és standard körülmények között kell történniük, hisz a neuronális aktivitáshoz vezető tényezők módosíthatják a teszt eredményét. Emellett, mivel a hiperventiláció kiváltotta hipokapnia jelentősen gátolja a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges vazodilatációt, dinamikus cerebrális áramlási vizsgálatok során ugyancsak fokozott figyelmet kell fordítani a standard kísérleti feltételek megteremtéséhez, ezen belül az állandó légzésszám és pCO₂ biztosításához.

TCD tanulmányunk megerősítette, hogy a Braille-olvasás aktiválja az a. cerebri posterior (PCA) által ellátott occipitalis kérget vak résztvevőkben. Igazoltuk, hogy az önmagában a betű- és szófelismerés által okozott áramlásváltozás intenzitása és dinamikája a PCA-ban hasonló volt vakokban és látókban Braille-olvasás illetve nyomtatott szöveg olvasása során, mely közel azonos occipitalis kérgi aktivációra utalt a két vizsgálati csoportban. Rámutattunk továbbá, hogy látókban az olvasás, mint komplex stimulus által kiváltott PCA áramlásnövekedés mintegy kétharmada a fénystimulusnak volt köszönhető, és a változásnak csak egyharmadát okozta önmagában a betű- és szófelismerés, vagyis a szorosan értelmezett olvasás.

Fontosnak tartjuk hangsúlyozni, hogy a vaszkuláris rizikófaktorok, valamint az NSAID neurovaszkuláris kapcsolatra gyakorolt hatását fiatal, egészséges személyekben, döntően egyetemi hallgatókban végeztük, akiknek az érrendszere még egészséges. Feltételezhető, hogy idősebb, több vaszkuláris rizikófaktorral élőkben az akut alkoholfogyasztás és a dohányzás, csakúgy mint az NSAID agyi erekre és az agyi véráramlás szabolyázásra gyakorolt negatív hatásai hatványozottan érvényesülnek.

6. ÚJ EREDMÉNYEK, EREDMÉNYEINK GYAKORLATI HASZNOSÍTÁSA

6.1. ÚJ EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

- 1. Angiotenzinogén overexpressziót mutató egerekben 1 órás MCAO után az ischaemia súlyosabb, a penumbra mérete szignifikánsan kisebb, míg az AT1 receptorhiányos egerekben az ischaemia enyhébb, s a penumbra mérete nagyobb volt, mint a vad típusú egerekben.
- 2. A metabolikus eltérések kialakulásáért felelős CBF küszöbérték az angiotenzinogént overexpresszáló egerekben nagyobb, míg az AT1 receptorhiányos egerekben kisebb volt, mint a kontroll állatokban, jelezve, hogy az angiotenzinogént overexpresszáló egerekben az agyszövet érzékenyebb, míg az AT1 receptorhiányos egerekben rezisztensebb volt az ischaemiával szemben a kontroll állatokhoz képest.
- 3. In vitro végzett kísérletek bizonyították, hogy az AT1 receptor hiánya illetve gyógyszerrel történő blokkolása vaszkuláris tényezőktől és hemodinamikai hatásoktól mentes környezetben is kedvezően befolyásolta a neuronok átmeneti oxigén és glükóz hiánnyal szembeni rezisztenciáját.
- 4. Az 1 órás MCAO-t követő 10 órás reperfúzió során MR vizsgálattal igazoltuk, hogy a víz diffúzióját jelző, ischaemia során csökkent ADC érték a reperfúzió első 2 órájában szignifikánsan javult, majd a reperfúzió későbbi fázisában rosszabbodott. Adataink szerint az ADC másodlagos csökkenése hátterében nem volt szignifikáns hipoperfúzió.
- 5. Az ischaemia végi relatív ADC a reperfúzió során "javulást nem mutató" szöveti régióban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint azokban a területekben, ahol az ADC javult a korai reperfúzió idején, azt jelezve, hogy az ischaemia végén mért alacsony ADC érték a rossz kimenetel jelzője.
- 6. A "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szövet között sem az ischaemia végén, sem a reperfúzió elején mért relatív ADC nem volt képes differenciálni. Ezzel szemben az ADC érték másodlagos rosszabbodását a T2 relaxációs idő növekedése a reperfúzió korai szakaszában megelőzte, vagyis a quantitatív T2 érték már röviddel a recirkulációt követően hasznos a "másodlagos rosszabbodást mutató" és a "helyreállt" szöveti alcsoportok elkülönítésében.
- 7. Az energiametabolizmus károsodását (ATP depléciót) jelző relatív ADC érték mind az 1 órás MCAO végén, mind a reperfúzió 1. és 10. órájában a kontroll ADC kb. 77%-a volt, mely függetlenül a kísérlet fázisától egy, az ATP hiányt jól jelző stabil ADC küszöbértékre utalt. Eredményeink az ADC érték és a sejt energiastátusza közötti szoros kapcsolatot jelezték nemcsak az ischaemia, hanem a reperfúzió időszakában is, vagyis a relatív ADC érték jól használható az energiametabolizmus változásainak az időbeli követésére az átmeneti agyi ischaemia akut fázisának különböző időszakaiban.
- 8. Az agyszövet NAD (nikotin-amid-adenin-dinukleotid) tartalmának a csökkenése az 1 órás ischaemiát követő recirkuláció során nem előzte meg és mértékében sem haladta meg az ATP szint csökkenését. Ezek az adatok cáfolták az energiametabolizmus másodlagos károsodásának okaként felvetett PARP (poli(ADP-ribóz) polimeráz)

hipotézist, mely szerint átmeneti agyi ischaemiában a PARP túlzott aktivációja a NAD felhasználásához, s az energiametabolizmus folyamatában fontos kofaktorként szereplő NAD hiányán keresztül ATP deplécióhoz vezetne.

- 9. Akut alkoholbevitelt követően az MCA-ban mért áramlási sebesség nagyobb mértékben csökkent ortosztatikus stressz (HUT teszt) során, mint az alkoholfogyasztást megelőző kontroll időszakban.
- 10. A kontroll periódustól eltérően, az alkoholbevitel után a HUT teszt indukálta MCA áramlási sebesség relatív csökkenése hasonló volt, mint az MCA szintjére korrigált vérnyomás relatív csökkenése, s elmaradt a számított cerebrovaszkuláris rezisztencia index csökkenése is. Eredményeink arra utaltak, hogy az alkohol a HUT teszt alatt csökkent perfúziós nyomásnál az agyi rezisztenciaerek kompenzatorikus vazodilatációját gátolta, vagyis károsította az agyi autoregulatiót.
- 11. Dohányosokban a PCA-ban mért vizuális stimuláció indukálta relatív áramlási sebességnövekedés szignifikánsan kisebb volt a nem dohányzókhoz képest, vagyis a dohányzás gátolta a neurovaszkuláris kapcsolatot.
- 12. A dohányzás elhagyása után a vizuális stimuláció okozta, PCA-ban mérhető áramlási sebességnövekedés még fél évvel a dohányzás elhagyása után is alacsonyabb volt a nem dohányzókhoz viszonyítva, mely a dohányzás neurovaszkuláris kapcsolatot károsító <u>tartós</u> hatását jelezte.
- 13. A 15 mg/kg adagban alkalmazott acetazolamid (AZ) okozta szignifikáns vazodilatáció nem gátolta a neurovaszkuláris kapcsolathoz szükséges további dilatációt a rezisztenciaerekben, azaz nem gátolta a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulását. Adataink arra utaltak, hogy a neurovaszkuláris kapcsolat és az AZ okozta vazodilatáció egymástól részben független útvonalon valósult meg, vagyis a lokális agyi véráramlás akkor is alkalmazkodott a metabolikus igényekhez, amikor egyéb vazodilatátor hatás már a rezisztenciaerek dilatációját előidézte.
- 14. Az acetazolamid 15 mg/kg adagban nem okozott maximális vazodilatációt emberben, hisz a maximális acetazolamid hatás idején a neuronális aktiváció további vazodilatációt eredményezett az agyi mikroerekben.
- 15. Az intrakraniális erekben a terápiás dózisban alkalmazott indometacin mellett a naproxen hatására is csökkent az áramlási sebesség és nőtt a pulzatilitási index, vagyis mindkét NSAID vazokonstrikciót váltott ki az agyi rezisztenciaerekben.
- 16. Mind a hipokapnia, mind a terápiás dózisban alkalmazott indometacin és naproxen gátolta a neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges agyi vazodilatációt.
- 17. Míg a vizuális stimuláció kiváltotta maximális relatív véráramlási válasz a PCA-ban a hipokapnia alatt kevesebb, mint a fele volt a kontroll fázisban mért értéknek, a vizuális kiváltott potenciálok paraméterei nem változtak jelentősen, vagyis hipokapnia során a fiziológiás vérátáramlás növekedés mintegy fele is elegendő ahhoz, hogy a vizuális stimuláció során az occipitalis kérgi működés még ép maradjon.
- 18. A transzkraniális Doppler vizsgálat alkalmas volt vakokban a Braille írás okozta occipitalis kérgi aktiváció és a következményes PCA áramlási sebességfokozódás kimutatására.
- 19. Két különböző kísérleti protokollt használva igazoltuk, hogy önmagában a betű- és szófelismerés a vakok és látók csoportjában hasonló mértékű és dinamikájú

áramlásváltozást indukált a PCA-ban azt jelezve, hogy látókban a vizuális és vakokban a tapintási stimulus alapján történő betű- és szófelismerés hasonló occipitalis kérgi aktivációt eredményezett.

20. Látókban az olvasás hatására a PCA-ban bekövetkező áramlásnövekedés kétharmad részét az olvasáshoz szükséges fénystimulus okozta, míg a betű- és szófelismerésnek, vagyis a szorosan értelmezett olvasásnak csak az áramlásváltozás egyharmada volt köszönhető.

6.2. EREDMÉNYEINK GYAKORLATI HASZNOSÍTÁSA

- Az angiotenzin AT1 receptor hiánya, illetve blokkolása enyhébb ischaemiát, nagyobb penumbrát, s fokozott ischaemiával szembeni rezisztenciát eredményezett, így az AT1 receptor blokkolása nemcsak a magas vérnyomás kezelésében és a stroke megelőzésében, de a stroke kimenetelének javításában is szerepet játszhat.
- 2. Az átmeneti agyi fokális ischaemia különböző időszakaiban megfigyelt ADC érték és energiastátusz közötti szoros összefüggés azt igazolta, hogy a relatív ADC térkép jól használható az energiametabolizmus markereként használható a reverzibilis fokális cerebrális ischaemia akut szakának különböző fázisaiban.
- 3. Sikeres recirkulációs terápia akut fázisában humán tanulmányban is szükségesnek tartjuk az ismételt DWI vizsgálatok végzését az energiametabolizmus másodlagos károsodásának tanulmányozására.
- 4. Az ischaemia végén mért alacsony relatív ADC érték a rossz kimenetel jelzője, míg a reperfúzió korai szakaszában a T2 relaxációs idő növekedése a másodlagos károsodás előrejelzésére használható.
- 5. Reperfúziós terápia esetén a stroke kimenetel javítására a recirkuláció indukciója előtt alkalmazott, a másodlagos károsodás megelőzését célzó szerek gyógyszerkipróbálás keretében történő alkalmazása észszerű.
- 6. Adataink az energiametabolizmus másodlagos károsodásának okaként felvetett PARP (poli(ADP-ribóz) polimeráz) hipotézist cáfolták, így a PARP útvonal gátlása tranziens fokális agyi ischaemiában nagy valószínűséggel nem mérsékli a reperfúziós károsodást, kipróbálása nem célszerű.
- 7. Az akut alkoholbevitel az agyi autoreguláció károsításával fokozhatja a syncope és a stroke rizikóját. Alkoholfogyasztást követően fokozott óvatosság szükséges az ortosztatikus hipotenzió elkerülésére (hirtelen felállás és tartós álló helyzet kerülése, fokozott folyadékbevitel).
- 8. A dohányzás neurovaszkuláris kapcsolatot és agyi véráramlás szabályozását tartósan károsító hatása miatt (is) mindent meg kell tenni a dohányzás káros hatásainak a mind szélesebb körű ismertetésére. Ismeretterjesztő kampányokkal el kell érni, hogy embertársaink a dohányzásra ne szokjanak rá, vagy a már dohányosok a dohányzásról szokjanak le.
- 9. Az acetazolamid provokációs tesztek során fontos, hogy a vizsgálat nyugodt és standard körülmények között történjen, hisz neuronális aktivitáshoz vezető tényezők (fényinger, hanginger, gondolkodás, ujjmozgás...) módosíthatják a teszt eredményét.
- 10. Mivel az indometacin és naproxen, valamint a hiperventiláció kiváltotta hipokapnia vazokonstrikciót váltott ki a cerebrális rezisztenciaerekben és szignifikánsan gátolta a

neurovaszkuláris kapcsolat kialakulásához szükséges vazodilatációt, fontos szem előtt tartani, hogy dinamikus cerebrális áramlási vizsgálatok során standard kísérleti feltételek, ezen belül állandó légzésszám és pCO₂ biztosítása szükséges.

- 11. A hiperventiláció és nem-steroid gyulladásgátló gyógyszerek a vazokonstrikciót előidéző hatásuk és a neuronális aktiváció indukálta vazodilatáció gátlása révén növelhetik a kedvezőtlen klinikai kimenetel kockázatát rossz vér oxigenizáció (pl. súlyos légzésfunkciós zavar), súlyos anaemia, szignifikáns cerebrális hipoperfúzió veszélye (pl. súlyos a. carotis interna stenosis, vazospazmus, ischaemiás stroke), illetve megnövekedett oxigénigény (pl. status epilepticus) esetén. Ezekben az esetekben a hipokapnia és az NSAID-ok gátolhatják a megfelelő vérellátást biztosító, vazodilatációt igénylő kompenzatorikus folyamatokat, tovább rontva ezzel az oxigén ellátás és igény közötti felborult egyensúlyt, s fokozva a cerebrális hipoxia veszélyét.
- 12. Korai vakokban végzett vizsgálataink eredményei alapján részleges occipitalis károsodás esetén az olvasni nem képes betegekben kognitív rehabilitáció keretében alakzatok, dombornyomott betűk felismerésének a gyakorlásával lehet a peristriatalis régiót aktiválni.
- 13. Az olvasás során a fénystimulusnak meghatározó szerepe van az occipitalis kérgi aktivációban, ezért olvasás során a vizuális fáradtság mértékét a megvilágítás módja (pl. saját fényforrással bíró monitorról, vagy reflektált fény mellett könyvből olvasás) befolyásolhatja.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Aaslid R, Lindegaard KF, Sorteberg W, Nornes H. Cerebral autoregulation dynamics in humans. Stroke. 1989;20:45-52.
- Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. J Neurosurg. 1982;6:769-74.
- Aaslid R. Cerebral autoregulation and vasomotor reactivity. Front Neurol Neurosci. 2006;21:216-28,
- Abe K, Araki T, Kogure K. Recovery from edema and of protein synthesis differs between the cortex and caudate following transient focal cerebral ischemia. J Neurochem. 1988;51:1470-6.
- Adami A, Thijs V, Tong DC, Beaulieu C, Moseley ME, Yenari MA. Use of diffusion weighted MRI to predict the occurrence and severity of hemorrhagic transformation in a rabbit model of embolic stroke. Brain Res 2002;944:32-9.
- Allen K, Busza AL, Crockard HA, Frackowiak RSJ, Gadian DG, Proctor E, Russell RWS. Acute cerebral ischemia: concurrent changes in cerebral blood flow, energy metabolites, pH, and lactate measured with Hydrogen clearance and 31P and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. III. Changes following ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1988;8:816-21.
- Alpers BJ, Berry RG, Paddison RM. Anatomical studies of the circle of Willis in normal brain. AMA Arch Neurol Psychiatry. 1959;81:409-18.
- Andreoli SP. Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. Pediatr Res. 1989;25:97-101.
- Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:1048-56.
- Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. Shock. 2004;21:401-9.
- Aschermann Z, Nagy F, Perlaki G, Janszky J, Schwarcz A, Kovacs N, Bogner P, Komoly S, Orsi G. 'Wind-up' in Parkinson's disease: A functional magnetic resonance imaging study. Eur J Pain. 2015;19:1288-97. doi:10.1002/ejp.659
- Astrup J, Symon L, and Siesjö BK. Thresholds in cerebral ischemia—The ischemic penumbra. Stroke. 1981;12:723-725.
- Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interactions with feedback modifiers. Biochemistry. 1968;7:4030-4.
- Azevedo E, Rosengarten B, Santos R, Freitas J, Kaps M. Interplay of cerebral autoregulation and neurovascular coupling evaluated by functional TCD in different orthostatic conditions. J Neurol. 2007;254:236-41.
- Back T, Hoehn-Berlage M, Kohno K, Hossmann K-A. Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. Stroke. 1994;25:494-500.
- Back T, Kohno K, and Hossmann K-A. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression Effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. J Cereb Blood Flow Metab. 1994b;14:12-9.
- Bakalova RA, Matsuura T, Kanno I. Cyclooxygenase-pathway participates in the regulation of regional cerebral blood flow in response to neuronal activation under normo- and hypercapnia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002;67:379-88.
- Barden AE, Croft KD, Beilin LJ, Phillips M, Ledowski T, Puddey IB. Acute effects of red wine on cytochrome P450 eicosanoids and blood pressure in men. J Hypertens. 2013;31:2195-202. doi:10.1097/HJH.0b013e328364a27f

- Barlinn K, Alexandrov AV. Sonothrombolysis in ischemic stroke. Curr Treat Options Neurol. 2013;15:91-103. doi: 10.1007/s11940-012-0214-5.
- Barry DI, Strandgaard S, Graham DI, Braendstrup O, Svendsen UG, Vorstrup S, Hemmingsen R, Bolwig TG. Cerebral blood flow in rats with renal and spontaneous hypertension: resetting of the lower limit of autoregulation. J Cereb Blood Flow Metab. 1982;2:347-53.
- Barzó P, Bari F, Dóczi T, Jancsó G, Bodosi M. Significance of the rate of systemic change in blood pressure on the short-term autoregulatory response in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Neurosurgery. 1993;32:611-8.
- Barzó P, Pávics L, Borda L, Bodosi M, Dóczi T, Katona E. [Determination of the cerebrovascular reserve capacity by using acetazolamide as well as transcranial Doppler and SPECT tests]. Orv Hetil. 1992;133(37):2347-50.
- Barzó P, Vörös E, Bodosi M. Use of transcranial Doppler sonography and acetazolamide test to demonstrate changes in cerebrovascular reserve capacity following carotid endarterectomy. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1996;11:83-9.
- Baumgartner RW. Handbook on Neurovascular Ultrasound. Karger, Basel, 2006;21:1-10.
- Beckman JA, Liao JK, Hurley S, Garrett LA, Chui D, Mitra D, Creager MA. Atorvastatin restores endothelial function in normocholesterolemic smokers independent of changes in loWDensity lipoprotein. Circ Res. 2004;95:217-23.
- Bednar MM, Gross CE. Aspirin reduces experimental cerebral blood flow in vivo. Neurol Res. 1999;21:488-90.
- Bednar MM, Raymond S, McAuliffe T, Lodge PH, Gross CE. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. Stroke. 1991;22:44-50.
- Behar K, Rothman DL, Hossmann K-A. NMR spectroscopic investigation of the recovery of energy and acid-base homeostasis in the cat brain after prolonged ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1989;9:655-65.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Res. 1996;739:88-96.
- Bennett T, Gardiner SM. Nervous Control of Blood Vessels. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996.
- Bere Z, Obrenovitch TP, Bari F, Farkas E. Ischemia-induced depolarizations and associated hemodynamic responses in incomplete global forebrain ischemia in rats. Neuroscience. 2014;260:217-26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.032.

Bereczki D, Csiba L. Spatial and temporal changes in tissue pH and ATP distribution in a new model of reversible focal forebrain ischemia in the rat. Metab Brain Dis. 1993;8:125-35.

- Berényi E. Debreceni Egyetem, MR képalkotás, 2011. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0019_1A_MR_kepalkotas/adatok.html
- Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJ, van Walderveen MA, Staals J, Hofmeijer J, van Oostayen JA, Lycklama à Nijeholt GJ, Boiten J, Brouwer PA, Emmer BJ, de Bruijn SF, van Dijk LC, Kappelle LJ, Lo RH, van Dijk EJ, de Vries J, de Kort PL, van Rooij WJ, van den Berg JS, van Hasselt BA, Aerden LA, Dallinga RJ, Visser MC, Bot JC, Vroomen PC, Eshghi O, Schreuder TH, Heijboer RJ, Keizer K, Tielbeek AV, den Hertog HM, Gerrits DG, van den Berg-Vos RM, Karas GB, Steyerberg EW, Flach HZ, Marquering HA, Sprengers ME, Jenniskens SF, Beenen LF, van den Berg R, Koudstaal PJ, van Zwam WH, Roos YB, van der Lugt A, van Oostenbrugge RJ, Majoie CB, Dippel DW; MR CLEAN Investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. N Engl J Med. 2015;372:11-20.

- Betz AL, Ianotti F, Hoff JT. Brain edema: a classification based on blood–brain barrier integrity. Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews. 1989;1:13354.
- Biestro AA, Alberti RA, Soca AE, Cancela M, Puppo CB, Borovich B. Use of indomethacin in brain-injured patients with cerebral perfusion pressure impairment: preliminary report. J Neurosurg. 1995;83:627-30.
- Blanco VM, Stern JE, Filosa JA. Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294:2855-63.
- Boms N, Yonai Y, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L, Oláh L. Effect of smoking cessation on visually evoked cerebral blood flow response in healthy volunteers. J Vasc Res. 2010;47:214-20.
- Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. Biochem Pharmacol. 1998;56:1549-59.
- Bourgeois JP, Rakic P. Synaptogenesis in the occipital cortex of macaque monkey devoid of retinal input from early embryonic stages. Eur J Neurosci. 1996;8:942-50.
- Boyajian RA, Otis SM. Acute effects of smoking on human cerebral blood flow. A transcranial Doppler ultrasonography study. J Neuroimaging. 2000;10:204-8.
- Brauer P, Kochs E, Werner C, Bloom M, Policare R, Pentheny S, Yonas H, Kofke WA, Schulte am Esch J. Correlation of transcranial Doppler sonography mean flow velocity with cerebral blood flow in patients with intracranial pathology. J Neurosurg Anesthesiol. 1998;10:80-5.
- Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. J Neurosci Res. 1995;42:674-83.
- Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. FEBS Lett. 1997;414:117-21.
- Bruhn H, Fransson P, Frahm J. Modulation of cerebral blood oxygenation by indomethacin: MRI at rest and functional brain activation. J Magn Reson Imaging. 2011;13:325-34.
- Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. J Biol Chem. 1995;270:10828-32.
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. J Clin Invest. 1991;87:432-8.
- Bullen C. Impact of Tobacco Smoking and Smoking Cessation on Cardiovascular Risk and Disease. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008;6:883-95.
- Burns, D.M. Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. Prog Cardiovasc Dis. 2003;46:11-29.
- Burton H, McLaren DG, Sinclair LJ. Reading embossed capital letters: an fMRI study in blind and sighted individuals. Hum Brain Mapp. 2006;27:325-339.
- Burton H, Snyder AZ, Conturo TE, Akbudak E, Ollinger JM, Raichle ME. Adaptive changes in early and late blind: an fMRI study of Braille reading. J Neurophysiol. 2002;87:589-607.
- Busija DW, Bari F, Domoki F, Horiguchi T, Shimizu K. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. Prog Neurobiol. 2008;86:379-95. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.008.
- Büchel C, Price C, Frackowiak RS, Friston K. Different activation patterns in the visual cortex of late and congenitally blind subjects. Brain 1998;121:409-19.
- Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, Wu TY, Brooks M, Simpson MA, Miteff F, Levi CR, Krause M, Harrington TJ, Faulder KC, Steinfort BS, Priglinger M, Ang T, Scroop R, Barber PA,

McGuinness B, Wijeratne T, Phan TG, Chong W, Chandra RV, Bladin CF, Badve M, Rice H, de Villiers L, Ma H, Desmond PM, Donnan GA, Davis SM; EXTEND-IA Investigators. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection EXTEND-IA Investigators. N Engl J Med. 2015;372:1009-18.

- Canevari L, Kuroda S, Bates TE, Clark JB, Siesjö BK. Activity of mitochondrial respiratory chain enzymes after transient focal ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:1166-9.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia and reperfusion injury. J Pathol. 2000;190:255-66.
- Carey BJ, Panerai RB, Potter JF. Effect of aging on dynamic cerebral autoregulation during head-up tilt. Stroke. 2003;34:1871-5.
- Carter JR, Stream SF, Durocher JJ, Larson RA. Influence of acute alcohol ingestion on sympathetic neural responses to orthostatic stress in humans. Am J Physiol. 2011;300:E771-8. doi:10.1152/ajpendo.00674.2010
- Catto A, Carter AM, Barrett JH, Stickland M, Bamford J, Davies JA, Grant PJ. Angiotensinconverting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease. Stroke. 1996;27:435-40.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. Circulation. 1993;88:2149-55.
- Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:13915-20.
- Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke. 1996,27:1124-9.
- Charriaut-Marlangue C, Margaill I, Plotkine M, Ben-Ari Y. Early endonuclease activation following reversible focal ischemia in the rat brain. J Cereb Blood Flow Metab. 1995;15:385-8.
- Chaudhuri KR, Maule S, Thomaides T, Pavitt D, Mathias CJ. Alcohol ingestion lowers supine blood pressure, causes splanchnic vasodilatation and worsens postural hypotension in primary autonomic failure. J Neurol. 1994;241:145-52.
- Chemtob S, Beharry K, Barna T, Varma DR, Aranda JV. Differences in the effects in the newborn piglet of various nonsteroidal antiinflammatory drugs on cerebral blood flow but not on cerebrovascular prostaglandins. Pediatr Res. 1991;30:106-11.
- Cheng NT, Kim AS. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke within 3 hours versus between 3 and 4.5 hours of symptom onset. The Neurohospitalist. 2015;5:101-9. doi:10.1177/1941874415583116.
- Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr Opin Neurobiol. 1996;6:667-72.
- Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G. Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:1191-1201.
- Chong ZZ, Xu QP, Sun JN. Effects and mechanism of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophil induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. Acta Pharmacol Sin. 2001;22:679-84.
- Christmann V, Liem KD, Semmekrot BA, van de Bor M. Changes in cerebral, renal and mesenteric blood flow velocity during continuous and bolus infusion of indomethacin. Acta Paediatr. 2002;91:440-6.
- Chrysant SG. The role of angiotensin II receptors in stroke protection. Curr Hypertens Rep. 2012;14:202-8. doi: 10.1007/s11906-012-0257-8.
- Chung O, Unger T. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. Am J Hypertension. 1999;12:150S-156S.

- Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. JAMA. 1999;282:2019-26.
- Coles JP, Fryer TD, Coleman MR, Smielewski P, Gupta AK, Minhas PS, Aigbirhio F, Chatfield DA, Williams GB, Boniface S, Carpenter TA, Clark JC, Pickard JD, Menon DK. Hyperventilation following head injury: effect on ischemic burden and cerebral oxidative metabolism. Crit Care Med. 2007;35:568-78.
- Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. Mol Immunol. 1999;36:941-8.
- Cooke WH, Rickards CA, Ryan KL, Kuusela TA, Convertino VA. Muscle sympathetic nerve activity during intense lower body negative pressure to presyncope in humans. J Physiol. 2009;587(Pt 20):4987-99. doi:10.1113/jphysiol.2009.177352
- Cooper HK, Zalewska T, Kawakami S, Hossmann K-A. The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. J Neurochem. 1977;28:929-34.
- Czernin J, Phelps ME. Positron emission tomography scanning: current and future applications. Annu Rev Med. 2002;53:89-112.
- Csete K, Barzó P, Bodosi M, Papp JG. Influence of nitrovasodilators and cyclooxygenase inhibitors on cerebral vasoreactivity in conscious rabbits. Eur J Pharmacol 2001;412:301-9.
- Csete K, Vezekényi Z, Dóczi T, Papp JG, Bodosi M, Barzó P.Comparison of regional vasomotor responses to acetazolamide and CO2 in rabbit cerebrum and cerebellum, measured by a hydrogen clearance method. Acta Physiol Scand. 2004;182:287-94.
- Csiba L, Paschen W, Hossmann K-A. A topographic quantitative method for measuring brain tissue pH under physiological and pathophysiological conditions. Brain Res. 1983;289:334-7.
- D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. Mol Med. 2001;7:367-82.
- Dahl A, Russell D, Rootwelt K, Nyberg-Hansen R, Kerty E. Cerebral vasoreactivity assessed with transcranial Doppler and regional cerebral blood flow measurements. Dose, serum concentration, and time course of the response to acetazolamide. Stroke. 1995;26:2302-6.
- Dai W-J, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J. Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. Stroke. 1999;30:2391-9.
- Datz FL, Patch GG, Arias JM, Morton KA. Nuclear Medicine: A teaching profile. Mosby Yearbook, St. Louis, 1992.
- Davis D, Ulatowski J, Eleff S, Izuta M, Mori S, Shungu D, van Zijl PCM (1994) Rapid monitoring of changes in water diffusion coefficients during reversible ischemia in cat and rat brain. Magn Reson Med. 1994;31:454-60.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev. 2000;52:415-72.
- Debreczeni R, Amrein I, Kamondi A, Szirmai I. Hypocapnia induced by involuntary hyperventilation during mental arithmetic reduces cerebral blood flow velocity. Tohoku J Exp Med. 2009;217:147-54.
- De Volder AG, Bol A, Blin J, Robert A, Arno P, Grandin C, Michel C, Veraart C. Brain energy metabolism in early blind subjects: neural activity in the visual cortex. Brain Res. 1997;750:235-44.
- DeGracia DJ, Adamczyk S, Folbe AJ, Konkoly LL, Pittman JE, Neumar RW, Sullivan JM, Scheuner D, Kaufman RJ, White BC, Krause GS. Eukaryotic initiation factor 2 alpha

kinase and phosphatase activity during postischemic brain reperfusion. *Exp Neurol*. 1999;155:221-7.

- Dehay C, Horsburgh G, Berland M, Killackey H, Kennedy H. Maturation and connectivity of the visual cortex in monkey is altered by prenatal removal of retinal input. Nature. 1989;337:265-7.
- Del Pozzi AT, Schwartz CE, Tewari D, Medow MS, Stewart JM. Reduced cerebral blood flow with orthostasis precedes hypocapnic hyperpnea, sympathetic activation, and postural tachycardia syndrome. Hypertension. 2014;63:1302-8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02824
- Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res.* 2000;98:V73-V81.
- del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2003;23:879-94.
- del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. Stroke. 1991;22:1276-1283.
- del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risk for thrombolytic treatment in stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1998;65:1-9.
- Demady DR, Lowe ER, Everett AC, Billecke SS, Kamada Y, Dunbar AY, Osawa Y. Metabolism-based inactivation of neuronal nitric-oxide synthase by components of cigarette and cigarette smoke. Drug Metab Dispos. 2003;31:932-7.
- Démolis P, Florence G, Thomas L, Tran Dinh YR, Giudicelli JF, Seylaz J, Alkayed NJ. Is the acetazolamide test valid for quantitative assessment of maximal cerebral autoregulatory vasodilation? An experimental study. Stroke. 2000;31:508-15.
- Derdeyn CP, Videen TO, Yundt KD, Fritsch SM, Carpenter DA, Grubb RL, Powers WJ. Variability of cerebral blood volume and oxygen extraction: stages of cerebral haemodynamic impairment revisited. Brain. 2002;125:595-607.
- Detre JA, Zhang WG, Roberts DA, Silva AC, Williams DS, Grandis DJ, Koretsky AP, Leigh JS. Tissue specific perfusion imaging using arterial spin labeling. NMR Biomed. 1994;7:75-82.
- Di Russo F, Martínez A, Sereno MI, Pitzalis S, Hillyard SA. Cortical sources of the early components of the visual evoked potential. Hum Brain Mapp. 2002;15:95-111.
- Dietrich WD. Morphological manifestations of reperfusion injury in brain. Ann N Y Acad Sci. 1994;723:15-24.
- Dijkhuizen RM, Knollema S, van der Worp HB, Ter Horst GJ, De Wildt DJ, van der Sprenkel JWB, Tulleken KAF, Nicolay K. Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat. Stroke. 1998;29:695-704.
- Dirnagl U, Pulsinelli W. Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1990;10:327-36.
- Dirnagl U. Metabolic aspects of neurovascular coupling. Adv Exp Med Biol. 1977;413:155-69.
- Djuricic B, Röhn G, Paschen W, Hossmann K-A. Protein synthesis in the hippocampal slice: transient inhibition by glutamate and lasting inhibition by ischemia. Metab Brain Dis. 1994;9:235-47.
- Dobbin J, Crockard HA, Ross-Russell R. Transient blood-brain barrier permeability following profound temporary global ischemia: an experimental study using 14C-AIB. J Cereb Blood Flow Metab. 1989;9:71-8.
- Dóczi T, Schwarcz A. Correlation of apparent diffusion coefficient and computed tomography density in acute ischemic stroke. Stroke. 2003;34:e17-8.

- Doi Y, Yoshinari M, Yoshizumi H, Ibayashi S, Wakisaka M, and Fujishima M. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. Atherosclerosis. 1997;132,145-50.
- Donnan GA. Endovascular therapy: the dawning of a new era. Int J Stroke. 2015;10:463.
- Droste DW, Ringelstein EB. Detection of high intensity transient signals (HITS): how and why? Eur J Ultrasound. 1998;7:23-9.
- Dunn KM, Nelson MT. Potassium channels and neurovascular coupling. Circ J. 2010;74:608-16.
- Edvinsson L, Krause DN. Cerebral Blood Flow and Metabolism. Lippincott Williams end Wilkins, Philadelphia, 2002.
- Edvinsson L, Mackenzie ET, Mcculloch H. Cerebral Blood Flow and Metabolism. Raven Press, New York, 1993.
- Edwards AD, Wyatt JS, Richardson C, Potter A, Cope M, Delpy DT, Reynolds EO. Effects of indomethacin on cerebral haemodynamics in very preterm infants. Lancet. 1990;335:1491-5.
- Edwards MR, Shoemaker JK, Hughson RL. Dynamic modulation of cerebrovascular resistance as an index of autoregulation under tilt and controlled PET(CO(2)). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002;283:R653-62.
- Eliasson MJL, Huang ZH, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, and Moskowitz MA. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. J Neurosci. 1999;19:5910-8.
- Endres M, Wang Z-Q, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1997;17:1143-51.
- Fenstermacher JD, Knight RA, Ewing JR, Nagaraja T, Nagesh V, Yee JS, Amiego PA. Estimating blood-brain barrier opening in a rat model of hemorrhagic transformation with Patlak plots of Gd-DTPA contrast-enhanced MRI. Acta Neurochir Suppl. 2003;86:35-7.
- Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:22290-5.
- Ferrari J, Seyfang L, Lang W. Can online benchmarking increase rates of thrombolysis? Data from the Austrian stroke unit registry. J Neurol. 2013;260:2271-8. doi:10.1007/s00415-013-6964-5
- Figley CR, Stroman PW. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. Dev Cogn Neurosci. 2011;1:199-216. doi: 10.1016/j.dcn.2011.04.001.
- Filosa JA, Blanco VM. Neurovascular coupling in the mammalian brain. Exp Physiol. 2007;92:641-6.
- Filosa JA, Morrison HW, Iddings JA, Du W, Kim KJ. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. Neuroscience. 2016;323:96-109. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.064.
- Fischer M, Bockhorst K, Hoehn-Berlage M, Schmitz B, Hossmann K-A. Imaging of the apparent diffusion coefficient for the evaluation of cerebral metabolic recovery after cardiac arrest. Magn Reson Imaging. 1995;13:781-90.
- Fisher M. The ischemic penumbra: Identification, evolution and treatment concepts. Cerebrovasc Dis. 2004;17:1-6.
- Folbergrova J, Zhao Q, Katsura K-I, Siesjö BK (1995) N-tert-Butylalpha-phenylnitrone improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:5057-61.

- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. Science. 1988;241:462-4.
- Fujioka KA, Donville CM. Anatomy and freehand examination techniques. In: Newell DW, Aaslid R. (Eds.), Transcranial Doppler. Raven, New York, 1992: 9-31.
- Fukuda M, Poplawsky AJ, Kim SG. Submillimeter-resolution fMRI: Toward understanding local neural processing. Prog Brain Res. 2016;225:123-52. doi: 10.1016/bs.pbr.2016.03.003. doi: 10.1016/bs.pbr.2016.03.003.
- Fukuuchi Y, Tomita M, Koto A. (Eds.) Ischemic blood flow in the brain. Springer, Berlin, 2001.
- Fung M, Fure H, Sun W, Sun C, Shi NY, Dou Y, Su J, Swanson X, Mollnes TE. Preneutralization of C5a-mediated effects by the monoclonal antibody 137-26 reacting with the C5a moiety of native C5a without preventing C5 cleavage. Clin Exp Immunol. 2003;133:160-9.
- Fülesdi B, Síró P, Molnár C. Neuromonitoring using transcranial Doppler under critical care conditions. In Csiba L., Baracchini C. (Eds), Manual of Neurosonology, Cambridge University Press, Cambridge, 2015.
- Gabrielian ES, Amroian EA, Megrabian VI. Cerebral blood flow reactions to hypo- and hypercapnia during indomethacin inhibition of prostaglandin biosynthesis. Biull Eksp Biol Med. 1979;87:240-3.
- Gagnon L, Yücel MA, Dehaes M, Cooper RJ, Perdue KL, Selb J, Huppert TJ, Hoge RD, Boas DA. Quantification of the cortical contribution to the NIRS signal over the motor cortex using concurrent NIRS-fMRI measurements. Neuroimage. 2012; 59:3933-40.
- Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. Cardiovasc Res. 2004;61:498-511.
- George MS. Neuroactivation and Neuroimaging with SPECT. Springer-Verlag, New York, 1991.
- Giannini D, Leone A, Di Bisceglie D, Nuti M, Strata G, Buttitta F, Masserini L, Balbarini A. The effects of acute passive smoke exposure on endothelium-dependent brachial artery dilation in healthy individuals. Angiology. 2007;58:211-7.
- Giller CA, Bowman G, Dyer H, Mootz L, Krippner W. Cerebral arterial diameters during changes in blood pressure and carbon dioxide during craniotomy. Neurosurgery. 1993;32:737-41.
- Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: Penumbra, gene expression, neuroprotection. The 2002 Thomas Willis Lecture. Stroke. 2003;34:214-23.
- Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. J Appl Physiol. 2006;100:328-35.
- Gizewski ER, Gasser T, de Greiff A, Boehm A, Forsting M. Cross-modal plasticity for sensory and motor activation patterns in blind subjects. Neuroimage. 2003;19:968-75.
- Gommer ED, Staals J, van Oostenbrugge RJ, Lodder J, Mess WH, Reulen JP. Dynamic cerebral autoregulation and cerebrovascular reactivity: a comparative study in lacunar infarct patients. Physiol Meas. 2008; 29:1293-303.
- Gonul M, Asil T, Balci K, Celik Y, Turgut N, Uzunca I. Changing cerebral blood flow velocity detected by transcranial Doppler ultrasound during head up tilt in patients with multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2008;15:725-9. doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02179
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG,
 Willinsky RA, Sapkota BL, Dowlatshahi D, Frei DF, Kamal NR, Montanera WJ, Poppe
 AY, Ryckborst KJ, Silver FL, Shuaib A, Tampieri D, Williams D, Bang OY, Baxter BW,
 Burns PA, Choe H, Heo JH, Holmstedt CA, Jankowitz B, Kelly M, Linares G, Mandzia
 JL, Shankar J, Sohn SI, Swartz RH, Barber PA, Coutts SB, Smith EE, Morrish WF, Weill
 A, Subramaniam S, Mitha AP, Wong JH, Lowerison MW, Sajobi TT, Hill MD; ESCAPE

Trial Investigators. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. N Engl J Med. 2015;372:1019-30.

- Grassi GM, Somers VK, Renk WS, Abboud FM, Mark AL. Effects of alcohol intake on blood pressure and sympathetic nerve activity in normotensive humans: a preliminary report. J Hypertens Suppl. 1989;7:S20-1.
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science. 2004;305:626-9.
- Grossmann WM, Koeberle B. The dose-response relationship of acetazolamide on the cerebral blood flow in normal subjects. Cerebrovasc Dis. 2000;10:65-9.
- Gu H, Lu H, Ye FQ, Stein EA, Yang Y. Noninvasive quantification of cerebral blood volume in humans during functional activation. Neuroimage. 2006;30:377-87.
- Guan J, Zhang S, Zhou Q, Li C, Lu Z. Usefulness of transcranial Doppler ultrasound in evaluating cervical-cranial collateral circulations. Interv Neurol. 2013;2:8-18.
- Guo X, Oldham MJ, Kleinman MT, Phalen RF, Kassab GS. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291:H2354-61.
- Gyngell ML, Back T, Hoehn-Berlage M, Kohno K, Hossmann, K-A. Transient cell depolarization after permanent middle cerebral artery occlusion: An observation by diffusion-weighted MRI and localized 1H-MRS. Magn Reson Med. 1994;31:337-41.
- Haak T, Jungmann E, Raab C, Usadel KH. Elevated endothelin-1 level after cigarette smoking. Metabolism. 1994;43:267-269.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, et al. ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. Lancet. 2004;363:768-74. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15692-4.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med. 2008;359:1317-29. doi: 10.1056/NEJMoa0804656
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). JAMA. 1995;274:1017-25.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. Lancet. 1998;352:1245-51.
- Hahn T, Heinzel S, Plichta MM, Reif A, Lesch KP, Fallgatter AJ. Neurovascular coupling in the human visual cortex is modulated by cyclooxygenase-1 (COX-1) gene variant. Cereb Cortex. 2011;21:1659-66.
- Hakim AM. The cerebral ischemic penumbra. Can J Neurol Sci. 1987;14:557-9.
- Hallenbeck J, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early post ischemic period. Stroke. 1986;17:246-53.
- Hamar J. Az idegrendszer vérkeringésének szabályozása és kölcsönhatások. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0094_neurologia_hu/ch07.html#id848467
- Hamilton R, Keenan JP, Catala M, Pascual-Leone A. Alexia for Braille following bilateral occipital stroke in an early blind woman. Neuroreport. 20000;11:237-40.

- Hammerman C, Glaser J, Schimmel MS, Ferber B, Kaplan M, Eidelman AI. Continuous versus multiple rapid infusions of indomethacin: effects on cerebral blood flow velocity. Pediatrics 1995;95:244-8.
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1996;16:605-11.
- Harlan JM (1985) Leukocyte-endothelial interactions. Blood. 1991;65:513-25.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Freyer D, Weih M, Dirnagl U, Weber JR, Hörtnagl H. Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. FASEB J. 2000;14:1814-24.
- Harris NG, Zilkha E, Houseman J, Symms MR, Obrenovitch TP, Williams SR. The relationship between the apparent diffusion coefficient measured by magnetic resonance imaging, anoxic depolarization, and glutamate efflux during experimental cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:28-36.
- Hart ML, Walsh MC, Stahl GL. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. Mol Immunol. 2004;41:165-71.
- Hasegawa Y, Fisher M, Latour LL, Dardzinski BJ, Sotak CH. MRI diffusionmapping of reversible and irreversible ischemic injury in focal brain ischemia. Neurology. 1994;44:1484-90.
- Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:306-15.
- Hata R, Mies G, Wiessner C, Fritze K, Hesselbarth D, Brinker G, Hossmann K-A. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. J Cereb Blood Flow Metab. 1998;18:367-75.
- Heiss WD, Graf R, Lottgen J, Ohta K, Wagner R. Repeat positron emission tomographic studies in transient middle cerebral artery occlusion in cats: residual perfusion and efficacy of postischemic reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:388-400.
- Heiss WD. Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery. Stroke. 1992;23:1668-72.
- Heiss WD. Ischemic penumbra: Evidence from functional imaging in man. J. Cereb.Blood Flow Metab. 2000;20:1276-93.
- Helpern JA, Dereski MO, Knight RA, Ordidge RJ, Chopp M, Qing ZX. Histopathological correlations of nuclear magnetic resonance imaging parameters in experimental cerebral ischemia. Magn Reson Imaging. 1993;11:241-6.
- Hillered L, Chan PH. Role of arachidonic acid and other free fatty acids in mitochondrial dysfunction in brain ischemia. J Neurosci Res. 1988;20:451-6.
- Hillis AE, Wityk RJ, Beauchamp NJ, Ulatowski JA, Jacobs MA, Barker PB. Perfusionweighted MRI as a marker of response to treatment in acute and subacute stroke. Neuroradiology. 2004;46:31-39.
- Hilz MJ, Axelrod FB, Haertl U, Brown CM, Stemper B. Transcranial Doppler sonography during head up tilt suggests preserved central sympathetic activation in familial dysautonomia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;72:657-60.
- Hoehn-Berlage M, Norris DG, Kohno K, Mies G, Leibfritz D, Hossmann, K-A. Evolution of regional changes in apparent diffusion coefficient during focal ischemia of rat brain: The relationship of quantitative diffusion NMR imaging to reduction in cerebral blood flow and metabolic disturbances. J Cereb Blood Flow Metab. 1995;15:1002-11.
- Hoffman WE, Albrecht RF, Pelligrino D, Miletich DJ. Effects of prostaglandins on the cerebral circulation in the goat. Prostaglandins. 1982;23:897-905.

- Holman BL, Devous MD. Functional brain SPECT: the emergence of a powerful clinical method. J Nucl Med. 1992;33:1888-904.
- Horstick G. C1-esterase inhibitor in ischemia and reperfusion. Immunobiology. 2002;205:552-62.
- Hoshi Y. Functional near-infrared spectroscopy: current status and future prospects. J Biomed Opt. 2007;12:062106.
- Hossmann K-A, Fischer M, Bockhorst K, Hoehn-Berlage M. NMR imaging of the apparent diffusion coefficient (ADC) for the evaluation of metabolic suppression and recovery after prolonged cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1994;14:723-31.
- Hossmann KA, Hoehn-Berlage M. Diffusion and perfusion MR imaging of cerebral ischemia. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1995;7:187-217.
- Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. Stroke. 1980;11:583-92.
- Hossmann K-A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. Cellular and Molecular Neurobiology. 2006;26:1057-1083. doi: 10.1007/s10571-006-9008-1.
- Hossmann K-A. Periinfarct depolarizations. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1996;8:195-208.
- Hossmann K-A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. Ann. Neurol. 1994;36:557-65.
- Howarth C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. Front Neurosci. 2014;8:103. doi: 10.3389/fnins.2014.00103.
- Hughson RL, Edwards MR, O'Leary DD, Shoemaker J.K. Critical analysis of cerebrovascular autoregulation during repeated head-up tilt. Stroke. 2001;32:2403-8.
- Iadecola C, Davisson RL. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. Cell Met. 2008;7:476-84.
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. Nat Neurosci. 2007;10:1369-76.
- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 2004;5:347-60.
- Iijima T, Mies G, Hossmann K-A. Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801. Effect on volume of ischemic injury. J Cereb Blood Flow Metab. 1992;12:727-33.
- Imberti R, Fuardo M, Bellinzona G, Pagani M, Langer M. The use of indomethacin in the treatment of plateau waves: effects on cerebral perfusion and oxygenation. J Neurosurg. 2005;102:455-9.
- Ireland MA, Vandongen R, Davidson L, Beilin LJ, Rouse IL. Acute effects of moderate alcohol conscription on blood pressure and plasma catecholamines. Clin Sci. 1984;66:643-8.
- Ishibashi K, Maeda T, Higuchi S, Yasukouchi A. Error and individual difference in cardiovascular responses to orthostatic stress in humans. J Physiol Anthropol Appl Hum Sci. 2005;24:339-43.
- Ito H, Takahashi K, Hatazawa J, Kim SG, Kanno I. Changes in human regional cerebral blood flow and cerebral blood volume during visual stimulation measured by positron emission tomography. J Cereb Blood Flow Metab. 2001;21:608-12.
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffmann TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:3521-5.
- Jacob G, Atkinson D, Jordan J, Shannon JR, Furlan R, Black BK, Robertson D, Effects of standing on cerebrovascular resistance in patients with idiopathic orthostatic intolerance, Am J Med. 1999;106:59-64.

- Jakovcevic D, Harder DR. Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. Curr Top Dev Biol. 2007;79:75-97.
- Janoff A, Schaefer S, Scherer J, Bean MA. Mediators in inflammation in leukocyte lysosomes. II. Mechanism of action of lysosomal cationic protein upon vascular permeability in the rat. J Exp Med. 1965:122:841-851.
- Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. Neurosurgery. 1998;43:1382-96.
- Jensen K, Freundlich M, Bunemann L, Therkelsen K, Hansen H, Cold GE. The effect of indomethacin upon cerebral blood flow in healthy volunteers: the influence of moderate hypoxia and hypercapnia. Acta Neurochir (Wien). 1993;124:114-9.
- Jones SC, Kharlamov A, Yanovski B, Kim DK, Easley KA, Yushmanov VE, Ziolko SK, Boada FE. Stroke onset time using sodium MRI in rat focal cerebral ischemia. Stroke. 2006;37:883-8.
- Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, San Román L, Serena J, Abilleira S, Ribó M, Millán M, Urra X, Cardona P, López-Cancio E, Tomasello A, Castaño C, Blasco J, Aja L, Dorado L, Quesada H, Rubiera M, Hernandez-Pérez M, Goyal M, Demchuk AM, von Kummer R, Gallofré M, Dávalos A; REVASCAT Trial Investigators. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. REVASCAT Trial Investigators, N Engl J Med. 2015;372:2296-306.
- Kalanuria A, Nyquist PA, Armonda RA, Razumovsky A. Use of Transcranial Doppler (TCD) ultrasound in the Neurocritical Care Unit. Neurosurg Clin N Am. 2013;24:441-56.
- Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurol Sci. 1999;166:91-9.
- Katona E, Settakis G, Varga Z, Juhász M, Paragh G, Bereczki D, Fülesdi B, Páll D. Both nitric oxide and endothelin-1 influence cerebral blood flow velocity at rest and after hyperand hypocapnic stimuli in hypertensive and healthy adolescents. Kidney Blood Press Res. 2006;29:152-8.
- Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. JAMA. 1993;269:232-6.
- Kempski O, Staub F, Von Rosen F, Zimmer M, Neu A, Baethmann A. Molecular mechanisms of glial swelling in vitro. Neurochemical Pathology. 1988;9:109-25.
- Kerskens CM, Hoehn-Berlage M, Schmitz B, Busch E, Bock C, Gyngell ML, Hossmann K-A. Ultrafast perfusion-weighted MRI of functional brain activation in rats during forepaw stimulation: comparison with T2*-weighted MRI. NMR Biomed. 1995;8:20-3.
- Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:609-612.
- Kidwell CS, És mtsai. JL, Mattiello J, Starkman S, Vinuela F, Duckwiler G, Gobin YP, Jahan R, Vespa P, Villablanca JP, Liebeskind DS, Woods RP, Alger JR. Diffusion-perfusion MRI characterization of post-recanalization hyperperfusion in humans. Neurology. 2001;57:2015-21.
- Kim SG, Rostrup E, Larsson HB, Ogawa S, Paulson OB. Determination of relative CMRO₂ from CBF and BOLD changes: significant increase of oxygen consumption rate during visual stimulation. Magn Reson Med. 1999;41:1152-1161.
- Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, Metzger R, Hilgenfeldt U, Zimmermann F, Jacob H, Fuxe K, Ganten D, and Kaling M. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. EMBO J. 1992;11:821-7.

- Kiss, H., Németh, J.: Causes of blindness in Hungary. [A vakság okai Magyarországon.] Szemészet. 2013;150:103-110.
- Kitaura H, Uozumi N, Tohmi M, Yamazaki M, Sakimura K, Kudoh M, Shimizu T, Shibuki K. Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. Neurosci Res. 2007;59:160-71.
- Kleihues P, Kobayashi K, Hossmann K-A. Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia. J Neurochem. 1974;23:417-425.
- Knight RA, Dereski MO, Helpern JA, Ordidge RJ, Chopp M. Magnetic resonance imaging assessment of evolving focal cerebral ischemia. Stroke. 1994;25:1252-62.
- Ko W, Lang D, Hawes AS, Zelano JA, Isom OW, Krieger KH. Platelet-activating factor antagonism attenuates platelet and neutrophil activation and reduces myocardial injury during coronary reperfusion. J Surg Res. 1993;55:504-15.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. J Appl Physiol. 2006;100:307-17.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. Trends Neurosci. 2009;32:160-9.
- Kogure K, Alonso OF. A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. Brain Res. 1978;154:273-84.
- Kogure K, Busto R, Scheinberg P. The role of hydrostatic pressure in ischemic brain edema. Ann Neurol. 1981;9:273-82.
- Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J. Neurosci. Methods. 1987;20:83-90.
- Kohn RR, Cerami A, Monnier VM. Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. Diabetes. 1984;33:57-9.
- Kohno K, Hoehn-Berlage M, Mies G, Back T, Hossmann KA. Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. Magn Reson Imaging. 1995;13:73-80.
- Kondo M, Kunikata T, Okazaki K, Yasuda S, Isobe K, Itoh S. Relation between infusion rate of indomethacin and cerebral blood flow velocity. Pediatr Int. 2010;52:616-21.
- Krakow K, Ries S, Daffertshofer M, Hennerici M. Simultaneous assessment of brain tissue oxygenation and cerebral perfusion during orthostatic stress. Eur Neurol. 2000;43:39-46.
- Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke. 1998;29:705-18.
- Kubota K, Yamaguchi T, Abe Y, Fujiwara T, Hatazawa J, Matsuzawa T. Effects of smoking on regional cerebral blood flow in neurologically normal subjects. Stroke. 1983;14:720-4.
- Kupper JH, Muller M, Wolf I. NAD1 consumption in carcinogen-treated hamster cells overexpressing a dominant negative mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. Biochem Biophys Res Commun.1999;265:525-9.
- Kuroda S, Katsura K, Hillered L, Bates TE, Siesjö BK. Delayed treatment with a phenyl-Ntert-butyl nitrone attenuates secondary mitochondrial dysfunction after transient focal cerebral ischemia in the rat. Neurobiology of Disease. 1996;3:149-57.
- Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. Clin Neurosci. 1997;4:199-212.
- Kuroiwa T, Shibutani M, Tajima T, Hirasawa H, Okeda R. Vasogenic component of ischemic brain edema in experimental focal ischemia. Adv Neurol. 1990;52:548.
- Landmesser U, Harrison DG, Drexler H. Oxidant stress a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. Eur J Clin Pharmacol. 2005;12:1-7.
- Lansberg MG, Thijs VN, O'Brien MW, Ali JO, de Crespigny AJ, Tong DC, Moseley ME, Albers GW. Evolution of apparent diffusion coefficient, diffusion-weighted, and T2-weighted signal intensity of acute stroke. Am J Neuroradiol. 2001;22:637-44.

- Lassila R, Seyberth HW, Haapanen A, Schweer H, Koskenvuo M, Laustiola KE. Vasoactive and atherogenic effects of cigarette smoking: a study of monozygotic twins discordant for smoking. British Medical Journal. 1988;297:955-7.
- Latour LL, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. Ann Neurol. 2004;56:468-77.
- Leányvári Z, Vastagh I, Fülesdi B, Szirmai I, Lengyel A, Csiba L, Bereczki D. Computed tomographic and transcranial Doppler sonographic findings in acute and subacute phases of middle cerebral artery strokes. J Clin Ultrasound. 2002;30:33-7.
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin M-L, Vignaud J, Laval Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion (IVIM) MR imaging. Radiology. 1988;168:497-505.

Lefer AM, Ma XL, Weyrich A, Lefer DJ. Endothelial dysfunction and neutrophil adherence as critical events in the development of reperfusion injury. Agents Actions Suppl. 1993;41:127-35.

- Leithner C, Royl G, Offenhauser N, Füchtemeier M, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U, Lindauer U. Pharmacological uncoupling of activation induced increases in CBF and CMRO₂. J Cereb Blood Flow Metab. 2010;30:311-22.
- Leniger-Follert E, and Lübbers DW. Regulation of microflow and behaviour of local tissue PO₂ during activation and anoxia of the brain cortex. Bibl Anat. 1977;15:345-9.
- Levy DE, Van Uitert RL, Pike CL. Delayed postischemic hypoperfusion: a potentially damaging consequence of stroke. Neurology. 1979;29:1245-52.
- Li F, Han SS, Tatlisumak T, Liu K-F, Garcia JH, Sotak CH, Fisher M. Reversal of acute apparent diffusion coefficient abnormalities and delayed neuronal death following transient focal cerebral ischemia. Ann Neurol. 1999;46:333-42.
- Li F, Liu KF, Silva MD, Omae T, Sotak CH, Fenstermacher JD, Fisher M, Hsu CY, Lin W. Transient and permanent resolution of ischemic lesions on diffusion-weighted imaging after brief periods of focal ischemia in rats: correlation with histopathology. Stroke. 2000a;31:946-54.
- Li F, Silva MD, Sotak CH, Fisher M. Temporal evolution of ischemic injury evaluated with diffusion-, perfusion-, and T2- weighted MRI. Neurology. 2000b;54:689-96.
- Li PA, Vogel J, Smith M, He QP, Kuschinsky W, Siesjö BK. Capillary patency after transient middle cerebral artery occlusion of 2 hours duration. Neurosci Lett. 1998;253:191-4.
- Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1995;15:389-97.
- Liebeskind DS. Collateral circulation. Stroke. 2003;34:2279-84.
- Lin AL, Fox PT, Hardies J, Duong TQ, Gao JH. Nonlinear coupling between cerebral blood flow, oxygen consumption, and ATP production in human visual cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:8446-8451.
- Lin AL, Fox PT, Yang Y, Lu H, Tan LH, Gao JH. Evaluation of MRI models in the measurement of CMRO₂ and its relationship with CBF. Magn Reson Med. 2008;60:380-9.
- Lin AL, Fox PT, Yang Y, Lu H, Tan LH, Gao JH. Time-dependent correlation of cerebral blood flow with oxygen metabolism in activated human visual cortex as measured by fMRI. Neuroimage. 2009;44:16-22.
- Lin AL, Lu H, Fox PT, Duong TQ. Cerebral blood volume measurements Gd-DTPA vs. VASO and their relationship with cerebral blood flow in activated human visual cortex. Open Neuroimag J. 2011a;5:90-5.
- Lin YJ, Po HL, Hsu HY, Chung CP, Sheng WY, Hu HH. Transcranial Doppler studies on cerebral autoregulation suggest prolonged cerebral vasoconstriction in a subgroup of

patients with orthostatic intolerance. Ultrasound Med Biol. 2011b;37:1554-60. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.06.008

Lindegaard KF, Bakke SJ, Grolimund P, Aaslid R, Huber P, Nornes H. Assessment of intracranial hemodynamics in carotid artery disease by transcranial Doppler ultrasound. J Neurosurg. 1985;63:890-8.

Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronalapoptosis. Cell Calcium. 1998;23:165-71.

- Lorell BH. Role of angiotensin AT1, and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and disease. Am J Cardiol. 1999;83:48H-52H.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
- Lutsep HL, Nesbit GM, Berger RM, Coshow WR. Does reversal of ischemia on diffusionweighted imaging reflect higher apparent diffusion coefficient values? J Neuroimaging. 2001;11:313-6.
- Maeda K, Hata R, Bader M, Walther T, Hossmann K-A. Larger anastomoses in angiotensinogen-knockout mice attenuate early metabolic disturbances after middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1999;19:1092-8.
- Maeda K, Mies G, Oláh L, Hossmann K-A. Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [14C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:10-4.
- Mark KS, Davis TP. Stroke: development, prevention and treatment with peptidase inhibitors. Peptides. 2000;21:1965-73.
- Markus HS, Harrison MJ: Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus. Stroke. 1992;23:668-73.
- Markus HS, King A, Shipley M, Topakian R, Cullinane M, Reihill S, Bornstein NM, Schaafsma A. Asymptomatic embolisation for prediction of stroke in the Asymptomatic Carotid Emboli Study (ACES): a prospective observational study. Lancet Neurol. 2010;9:663-71. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70120-4.
- Markus HS, Vallance P, Brown MM. Differential effect of three cyclooxygenase inhibitors on human cerebral blood flow velocity and carbon dioxide reactivity. Stroke. 1994;25:1760-4.
- Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1999;19:736-41.
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. Stroke. 1994;25:1469-75.
- Matsuura T, Takuwa H, Bakalova R, Obata T, Kanno I. Effect of cyclooxygenase-2 on the regulation of cerebral blood flow during neuronal activation in the rat. Neurosci Res. 2009;65:64-70.
- Maule S, Chaudhuri KR, Thomaides T, Pavitt D, McCleery J, Mathias CJ. Effects of oral alcohol on superior mesenteric artery blood flow in normal man, horizontal and tilted. Clin Sci (Lond). 1993;84:419-25.
- Memezawa H, Smith M-L, and Siesjö BK. Penumbral tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke. 1992;23:552-9.
- Metea MR, Newman EA. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. J Neurosci. 2006;26:2862-70.
- Meyer ZU, Link C, Jorns A, Nagel E, Kohl J. Preconditioning with the prostacyclin analog epoprostenol and cobra venom factor prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver xenotransplantation. Xenotransplantation. 2001;8:41-7.

- Mezei Z, Oláh L, Kardos L, Kovacs RK, Csiba L, Csepany T. Cerebrovascular hemodynamic changes in multiple sclerosis patients during head-up tilt table test: effect of high-dose intravenous steroid treatment. J Neurol. 2013;260:2335-42. doi:10.1007/s00415-013-6977-0
- Mies G, Auer LM, Ebhardt G, Traupe H, Heiss WD. Flow and neuronal density in tissue surrounding chronic infarction. Stroke. 1983;14:22-7.
- Mies G, Iijima T, Hossmann K-A. Correlation between periinfarctDC shifts and ischemic neuronal damage in rat. NeuroReport 1993a;4:709-11.
- Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann K-A. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1991;11:753-61.
- Mies G, Kohno K, Hossmann K-A. MK-801, a glutamate antagonist, lowers flow threshold for inhibition of protein synthesis after middle cerebral artery occlusion of rat. Neurosci Lett. 1993b;155:65-8.
- Mies G, Trapp T, Kilic E, Oláh L, Hata R, Hermann DM, Hossmann K-A. Relationship between DNA fragmentation, energy state, and protein synthesis after transient focal cerebral ischemia in mice. In: Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001:85-92.
- Mihálka L, Fekete I, Csépány T, Csiba L, Bereczki D. Basic characteristics of hospital stroke services in Eastern Hungary. Eur J Epidemiol. 1999;15:461-6.
- Mintorovitch J, Moseley ME, Chileuitt L, Shimizu H, Cohen Y, Weinstein PR. Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. Magn Reson Med. 1991;18:39-50.
- Mirro R, Leffler CW, Armstead W, Beasley DG, Busija DW. Indomethacin restricts cerebral blood flow during pressure ventilation of newborn pigs. Pediatr Res. 1988;24:59-62.
- Mishina M, Senda M, Kiyosawa M, Ishiwata K, De Volder AG, Nakano H, Toyama H, Oda K, Kimura Y, Ishii K, Sasaki T, Ohyama M, Komaba Y, Kobayashi S, Kitamura S, Katayama Y. Increased regional cerebral blood flow but normal distribution of GABA-A receptor in the visual cortex of subjects with early-onset blindness. Neuroimage. 2003;19:125-31.
- Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Nat Rev. 2006;5:75-86.
- Morita H, Ikeda H, Haramaki N, Eguchi H, Imaizumi T. Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. J Am Coll Cardiol. 2005;45:589-94.
- Mortimer AM, Bradley MD, Renowden SA. Endovascular therapy in hyperacute ischaemic stroke: history and current status. Interv Neuroradiol. 2013;19:506-18.
- Morvai V, Nádházi Z, Molnár GY, Ungváry GY, Folly G. Acute effects of low doses of alcohol on the cardiovascular system in young men. Acta Med Hung. 1988;45:339-48.
- Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, Wendland MF, Weinstein PR. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. Magn Reson Med. 1990;14:330-46.
- Mostofsky E, Chahal HS, Mukamal KJ, Rimm EB, Mittleman MA. Alcohol and immediate risk of cardiovascular events: a systematic review and dose-response meta-analysis. Circulation. 2016;133:979-87. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019743
- Muñoz MF, Puebla M, Figueroa XF. Control of the neurovascular coupling by nitric oxidedependent regulation of astrocytic Ca(2+) signaling. Front Cell Neurosci. 2015;9:59. doi: 10.3389/fncel.2015.00059.
- Nagy Z, Simon L, Bori Z.[Regulatory mechanisms in focal cerebral ischemia. New possibilities in neuroprotective therapy]. Ideggyogy Sz. 2002;55:73-85.

- Naqvi J, Yap KH, Ahmad G, Ghosh J. Transcranial Doppler ultrasound: a review of the physical principles and major applications in critical care. Int J Vasc Med. 2013;2013:629378.
- Narkiewicz K, Cooley RL, Somers VK. Alcohol potentiates orthostatic hypotension: implications for alcohol-related syncope. Circulation. 2000;101:398-402.
- Nedergaard M, Astrup J. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and (14C)- deoxyglucose phosphorylation. J Cereb Blood Flow Metab. 1986;6:607-15.
- Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, Sun GH, Moseley ME. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. Stroke. 2000;31:1965-72.
- Niehaus L, Böckeler GC, Kupsch A, Meyer BU. Normal cerebral hemodynamic response to orthostasis in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2002;8:255-9.
- Ning G, Malisza KL, Del Bigio MR, Bascaramurty S, Kozlowski P, Tuor UI. Magnetic resonance imaging during cerebral hypoxia- ischemia: T2 increases in 2-week-old but not 4-week-old rats. Pediatr Res. 1999;45:173-9.
- Nishigaya K, Yoshida Y, Sasuga M, Nukui H, Ooneda G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. Stroke. 1991;22:635-42.
- Nishijima NK, Koehler RC, Hurn PD, Eleff SM, Norris S, Jacobus WE, Traystman RJ. Postischemic recovery rate of cerebral ATP, phosphocreatinine, pH, and evoked potentials. Am J Physiol. 1989;257:H1860-70.
- Nishimura Y, Ito T. Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. Stroke;2000;31:2478-86.
- Nisselbaum JS, Green S. A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. Anal Biochem. 1969;27:212-7.
- Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. J Neurosci. 2000;20:763-70.
- Niwa K, Haensel C, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. Circ Res 2001;88:600-8.
- Norris DG, Hoehn-Berlage M, Dreher W, Kohno K, Busch E, Schmitz B. Characterization of middle cerebral artery occlusion infarct development in the rat using fast nuclear magnetic resonance proton spectroscopic imaging and diffusion-weighted imaging. J Cereb Blood Flow Metab. 1998;18:749-57.
- Nuriya M, Hirase H. Involvement of astrocytes in neurovascular communication. Prog Brain Res. 2016;225:41-62. doi: 10.1016/bs.pbr.2016.02.001.
- Odom JV, Bach M., Barber C, Brigell M, Marmor M, Tormene AP, Holder GE. Visual evoked potentials standard. Documenta ophthalmologica, 2004;108:115-23.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:9868-72.
- Ogawa S, Menon RS, Kim SG, Ugurbil K. On the characteristics of functional magnetic resonance imaging of the brain. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1998; 27:447-74.
- Ogawa S, Menon RS, Tank DW, Kim SG, Merkle H, Ellermann JM, Ugurbil K. Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. Biophys J. 1993;64:803-812.
- Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, Kim SG, Merkle H, Ugurbil K. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:5951-55.
- Oláh L, Raiter Y, Candale C, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L. Visually evoked cerebral vasomotor response in smoking and nonsmoking young adults, investigated by functional transcranial Doppler. Nicotine Tob Res. 2008;10:353-8.
- Oláh L, Wecker S, Hoehn M. Secondary deterioration of ADC after 1-hour transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2000a;20:1474-82.
- Oláh L, Wecker S, Hoehn M. Relationship of ADC changes and metabolic disturbances after 1 hour focal cerebral ischemia and at different reperfusion phases in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2001;21:430-439.
- Oláh L,: Ultrasound principles. In: Csiba L., Baracchini C (Eds), Manual of Neurosonology, Cambridge University Press, Cambridge, 2015.
- O'Leary DD, Hughson RL, Shoemaker JK, Greaves DK, Watenpaugh DE, Macias BR, Hargens AR. Heterogeneity of responses to orthostatic stress in homozygous twins. J Appl Physiol. 2007;102:249-254.
- Opitz E, Schneider M. Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns und den Mechanismus der Mangelwirkungen. Ergebn Physiol. 1950;46:126-260.
- Oppenheim C, Grandin C, Samson Y, Smith A, Duprez T, Marsault C, Cosnard G. Is there an apparent diffusion coefficient threshold in predicting tissue viability in hyperacute stroke? Stroke. 2001;32:2486-91.
- Oppenheim C, Lamy C, Touzé E, Calvet D, Hamon M, Mas JL, Méder JF. Do transient ischemic attacks with diffusion-weighted imaging abnormalities correspond to brain infarctions? AJNR Am J Neuroradiol. 2006;27:1782-7.
- Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. Neuroradiology. 2007;49:93-102.
- Pánczél G, Daffertshofer M, Ries S, Spiegel D, Hennerici M. Age and stimulus dependency of visually evoked cerebral blood flow responses. Stroke. 1999;30:619-23.
- Paschen W, Mies G, and Hossmann K-A. Threshold relationship between cerebral blood flow, glucose utilization, and energy metabolites during development of stroke in gerbils. Exp Neurol. 1992;117:325-333.
- Paschen W, Niebuhr I, Hossmann K-A. A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices. J Neurochem. 1981;36:513-7.
- Paschen W. Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic- cell damage. Med Hypotheses. 1996;47:283-8.
- Paschen W. Imaging of energy metabolites (ATP, glucose and lactate) in tissue sections: a bioluminescent technique. Prog Histochem Cytochem. 1990;20:1-122.
- Paschen W. Shutdown of translation: Lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis. J Cereb Blood Flow Metab. 2003;23:773-779.
- Patel ST, Kent KC. Risk factors and their role in the diseases of the arterial wall. Semin Vasc Surg. 1988;11:156-168.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. Cerebr Brain Metab Rev. 1990;2:161-92.
- Pávics L, Grünwald F, Barzó P, Ambrus E, Menzel C, Schomburg A, Borda L, Máté E, Bodosi M, Csernay L, Biersack HJ. Evaluation of cerebral vasoreactivity by SPECT and transcranial Doppler sonography using the acetazolamide test. Nuklearmedizin. 1994;33:239-43.
- Pellicer A, Aparicio M, Cabañas F, Valverde E, Quero J, Stiris TA. Effect of the cyclooxygenase blocker ibuprofen on cerebral blood volume and cerebral blood flow during normocarbia and hypercarbia in newborn piglets. Acta Paediatr. 1999;88:82-8.

- Pelligrino DA, Vetri F, Xu HL. Purinergic mechanisms in gliovascular coupling. Semin Cell Dev Biol. 2011;22:229-36. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.02.010.
- Petkova M, Rodrigo S, Lamy C, Oppenheim G, Touzé E, Mas JL, Méder JF, Oppenheim C. MR imaging helps predict time from symptom onset in patients with acute stroke: implications for patients with unknown onset time. Radiology. 2010;257:782-92. doi: 10.1148/radiol.10100461.
- Pickard J, Tamura A, Stewart M, McGeorge A, Fitch W. Prostacyclin, indomethacin and the cerebral circulation. Brain Res. 1980;197:425-31.
- Pickard JD, MacKenzie ET. Inhibition of prostaglandin synthesis and the response of baboon cerebral circulation to carbon dioxide. Nature. 1973;245:187-8.
- Pickles H, Brown MM, Thomas M, Hewazy AH, Redmond S, Zilka E, Marshall J. Effect of indomethacin on cerebral blood flow, carbon dioxide reactivity and the response to epoprostenol (prostacyclin) infusion in man. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1984;47:51-5.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly(ADPribose) polymerase, nitric oxide and cell death. Trends Pharmacol Sci. 1999;20.171-81.
- Pierpaoli C, Alger JR, Righini A, Mattiello J, Dickerson R, Pres DD, Barnett A, Di Chiro G. High temporal resolution diffusion MRI of global cerebral ischemia and reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1996;16:892-905.
- Pontén U, Ratcheson RA, Salford LG, Siesjö BK. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. J Neurochem. 1973;21:1127-38.
- Porta A, Catai AM, Takahashi AC, Magagnin V, Bassani T, Tobaldini E, van de Borne P, Montano N. Causal relationships between heart period and systolic arterial pressure during graded head-up tilt. Am J Physiol. 2011;300:R378-86. doi:10.1152/ajpregu.00553.2010
- Powers WJ, Derdeyn CP, Biller J, Coffey CS, Hoh BL, Jauch EC, Johnston KC, Johnston SC, Khalessi AA, Kidwell CS, Meschia JF, Ovbiagele B, Yavagal DR; American Heart Association Stroke Council. 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2015;46:3020-35. doi: 10.1161/STR.0000000000000074.
- Przybylowski CJ, Ding D, Starke RM, Durst CR, Crowley RW, Liu KC. Evolution of endovascular mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke. World Journal of Clinical Cases : WJCC. 2014;2:614-22. doi:10.12998/wjcc.v2.i11.614.
- Puppo C, Lopez L, Farina G, Caragna E, Moraes L, Iturralde A, Biestro A. Indomethacin and cerebral autoregulation in severe head injured patients: a transcranial Doppler study. Acta Neurochir (Wien). 2007;149:139-49.
- Purkayastha S, Sorond F. Transcranial Doppler ultrasound: technique and application. Semin Neurol. 2012;32:411-20. doi: 10.1055/s-0032-1331812.
- Quast MJ, Huang N, Hillman GR, Kent TA. The evolution of acute stroke recorded by multimodal magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging. 1993;11:465-471.
- Raij L, DeMaster EG, Jaimes EA. Cigarette smokeinduced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. Journal of Hypertension. 2001;19:891-7.
- Rasmussen M. Treatment of elevated intracranial pressure with indomethacin: friend or foe? Acta Anaesthesiol Scand 2005;49:341-50.
- Rasulo FA, De Peri E, Lavinio A. Transcranial Doppler ultrasonography in intensive care. Eur J Anaesthesiol Suppl. 2008;42:167-73.
- Razumovsky AY, DeBusk K, Calkins H, Snader S, Lucas KE, Vyas P, Hanley DF, Rowe PC. Cerebral and systemic hemodynamics changes during upright tilt in chronic fatigue syndrome. J Neuroimaging. 2003;13:57-67.

- Rinder CS, Gaal D, Student LA, Smith BR. Plateletleukocyte activation and modulation of adhesion receptors in pediatric patients with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;107:280-8.
- Robba C, Bacigaluppi S, Cardim D, Donnelly J, Bertuccio A, Czosnyka M. Non-invasive assessment of intracranial pressure. Acta Neurol Scand. 2016;134:4-21. doi: 10.1111/ane.12527.
- Robbins RA, Millatmal T, Lassi K, Rennard S, Daughton D. Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. Chest. 1997;112:313-8.
- Rogers RL, Meyer JS, Judd BW, Mortel KF. Abstention from cigarette smoking improves cerebral perfusion among elderly chronic smokers. Journal of the American Academy. 1985;253:2970-4.
- Rogers RL, Meyer JS, Shaw TG, Mortel KF, Hardenberg JP, Zaid RR. Cigarette smoking decreases cerebral blood flow suggesting increased risk for stroke. Journal of the American Academy. 1983;250;2796-800.
- Rogers RL, Meyer JS, Shaw TG, Mortel KF, Thornby J. The effects of chronic cigarette smoking on cerebrovascular responsiveness to 5 per cent CO₂ and 100 per cent O₂ inhalation. Journal of the American Geriatrics Society. 1984;32:415-20.
- Rosand J, Schwamm LH. Management of brain edema complicating stroke [review]. J Intensive Care Med. 2001;16:128-41.
- Rosenberg GA. Ischemic brain edema [review]. Prog Cardiovasc Dis. 1999;42:209-16.
- Rosenegger DG, Gordon GR. A slow or modulatory role of astrocytes in neurovascular coupling. Microcirculation. 2015;22(3):197-203. doi: 10.1111/micc.12184.
- Rosengarten B, Aldinger C, Kaufmann A, Kaps M. Comparison of visually evoked peak systolic and end diastolic blood flow velocity using a control system approach. Ultrasound Med Biol. 2001a;27:1499-503.
- Rosengarten B, Aldinger C, Spiller A, Kaps M. Neurovascular coupling remains unaffected during normal aging. J Neuroimaging. 2003a;13:43-7.
- Rosengarten B, Huwendiek O, Kaps M. Neurovascular coupling in terms of a control system: validation of a second-order linear system model. Ultrasound Med Biol 2001b;27:631-5.
- Rosengarten B, Kaps M. Peak systolic velocity Doppler index reflects most appropriately the dynamic time course of intact cerebral autoregulation. Cerebrovasc Dis. 2002a;13:230-4.
- Rosengarten B, Molnár S, Trautmann J, Kaps M. Simultaneous VEP and transcranial Doppler ultrasound recordings to investigate activation-flow coupling in humans. Ultrasound Med Biol. 2006;32:1171-80.
- Rosengarten B, Osthaus S, Kaps M. Overshoot and undershoot: control system analysis of haemodynamics in a functional transcranial Doppler test. Cerebrovasc Dis. 2002b;14:148-52.
- Rosengarten B, Paulsen S, Molnár S, Kaschel R, Gallhofer B, Kaps M. Activation-flow coupling differentiates between vascular and Alzheimer type of dementia. J Neurol Sci. 2007;257:149-54.
- Rosengarten B, Paulsen S, Molnár S, Kaschel R, Gallhofer B, Kaps M. Acetylcholine esterase inhibitor donepezil improves dynamic cerebrovascular regulation in Alzheimer patients. J Neurol. 2006;253:58-64.
- Rosengarten B, Sperner J, Görgen-Pauly U, Kaps M. Cerebrovascular reactivity in adolescents with migraine and tension-type headache during headache-free interval and attack. Headache. 2003b;43:458-63.
- Rosengarten B, Spiller A, Aldinger C, Kaps M. Control system analysis of visually evoked blood flow regulation in humans under normocapnia and hypercapnia. Eur J Ultrasound. 2003c;16:169-75.

- Roussel SA, Van Bruggen N, King MD, Gadian DG. Identification of collaterally perfused areas following focal cerebral ischemia in the rat by comparison of gradient echo and diffusionweighted MRI. J Cereb Blood Flow Metab. 1995;15:578-86.
- Roy CS, Sherrington CS. On the regulation of the blood supply of the brain. J Physiol. 1890;11:85-108.
- Rózsa L, Szabó S, Gombi R, Balázs E, Sztermen M. Transcranial Doppler sonography, a new non-invasive method for the study of cerebrovascular circulation. Orv Hetil. 1989;130:1669-72.
- Rush CR, Higgins ST, Hughes JR, Bickel WK, Wiegner MS. Acute behavioral and cardiac effects of alcohol and caffeine, alone and in combination, in humans. Behav Pharmacol. 1989;4:562-572.
- Ryan US, Rubanyi GM. Endothelial Regulation of the Vascular Tone. Marcel Dekker Inc, New York, 1992.
- Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. Cell Mol Neurobiol. 2005;25:485-512. DOI: 10.1007/s10571-005-4011-5
- Saavedra JM. Emerging features of brain angiotensin receptors. Regul Pept. 1999;85:31-45.
- Sadato N, Okada T, Honda M, Yonekura Y. Critical period for cross-modal plasticity in blind humans: a functional MRI study. Neuroimage. 2002;16:389-400.
- Sadato N, Okada T, Kubota K, Yonekura Y. Tactile discrimination activates the visual cortex of the recently blind naive to Braille: a functional magnetic resonance imaging study in humans. Neurosci Lett. 2004;359:49-52.
- Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Deiber M.P, Ibañez V, Hallett M. Neural networks for Braille reading by the blind. Brain. 1998;121:1213-29.
- Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Ibañez V, Deiber M.P, Dold G, Hallett M. Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. Nature. 1996;380:526-8.
- Sage JI, Duffy TE. Early changes in blood brain barrier permeability to small molecules after transient cerebral ischemia. Stroke. 1984;15:46-50.
- Saito R, Kawase T, Toya S, Koga K, Miura I. Reversibility of energy metabolism and intracellular pH after cerebral ischemia evaluated by 31P-MRS. Neurol Res. 1992;14:411-6.
- Sakabe T, Siesjö BK. The effect of indomethacin on the blood flow-metabolism couple in the brain under normal, hypercapnic and hypoxic conditions. Acta Physiol Scand. 1979;107:283-4.
- Sándor P. Az agyi vérellátás szabályozása. A mikrokeringés regulációjának fő tényezői. Nagy Z. (Szerk.) Vascularis Neurologia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2015:15-30.
- Sano M, Wendt PE, Wirsén A, Stenberg G, Risberg J, Ingvar DH. Acute effects of alcohol on regional cerebral blood flow in man. J Stud Alcohol. 1993;54:369-76.
- Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, Jansen O, Jovin TG, Mattle HP, Nogueira RG, Siddiqui AH, Yavagal DR, Baxter BW, Devlin TG, Lopes DK, Reddy VK, du Mesnil de Rochemont R, Singer OC, Jahan R; SWIFT PRIME Investigators. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. SWIFT PRIME Investigators, N Engl J Med. 2015;372:2285-95.
- Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. J Cereb Blood Flow Metab.2004;24:351-71.
- Scheidegger K, Wood J. Local application of angiotensin II to the rat carotid artery induces adventitial thickening. J Vasc Res. 1997;34:436-46.
- Schlaug G, Benfield A, Baird AE, Siewert B, Lovblad KO, Parker RA, Edelman RR, Warach S. The ischemic penumbra -operationally defined by diffusion and perfusion MRI. Neurology. 1999;53:1528-37.

- Schlaug G, Siewert B, Benfield A, Edelman RR, Warach S. Time course of the apparent diffusion coefficient (ADC) abnormality in human stroke. Neurology. 1997;49:113-9.
- Schreiber SJ, Gottschalk S, Weih M, Villringer A, Valdueza JM. Assessment of blood flow velocity and diameter of the middle cerebral artery during the acetazolamide provocation test by use of transcranial Doppler sonography and MR imaging. AJNR. 2000;21:1207-11.
- Schuier FJ, Hossmann K-A. Experimental brain infarcts in cats. II. Ischemic brain edema. Stroke. 1980;11:593-601.
- Schwartz JA, Speed NM, Gross MD, Lucey MR, Bazakis AM, Hariharan M, Beresford TP Acute effects of alcohol administration on regional cerebral blood flow: the role of acetate. Alcohol Clin Exp Res. 1993;17:1119-23.
- Selim M, Fink JN, Kumar S, Caplan LR, Horkan C, Chen Y, Linfante I, Schlaug G. Predictors of hemorrhagic transformation after intravenous recombinant tissue plasminogen activa- tor: prognostic value of the initial apparent diffusion coefficient and diffusion-weighted lesion volume. Stroke. 2002;33:2047-52.
- Settakis G, Lengyel A, Molnár C, Bereczki D, Csiba L, Fülesdi B. Transcranial Doppler study of the cerebral hemodynamic changes during breath-holding and hyperventilation tests. J Neuroimaging. 2002;12:252-8.
- Settakis G, Molnár C, Kerényi L, Kollár J, Legemate D, Csiba L, Fülesdi B. Acetazolamide as a vasodilatory stimulus in cerebrovascular diseases and in conditions affecting the cerebral vasculature. Eur J Neurol. 2003;10:609-20.
- Shaw BH, Loughin TM, Mackey DC, Robinovitch SN, Claydon VE. The effect of orthostatic stress type on cardiovascular control. Blood Press Monit. 2014;19:327-38. doi:10.1097/MBP.0000000000067
- Shimada N, Graf R, Rosner G, and Heiss WD. Ischemia-induced accumulation of extracellular amino acids in cerebral cortex, white matter, and cerebrospinal fluid. J Neurochem. 1993;60:66-71.
- Siemonsen S, Mouridsen K, Holst B, Ries T, Finsterbusch J, Thomalla G, Ostergaard L, Fiehler J. Quantitative T2 values predict time from symptom onset in acute stroke patients. Stroke 2009;40:1612-6.
- Siesjö BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB, Uchino H. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. Curr Prog Understanding Sec Brain Damage Trauma Ischemia. 1999a;73:7-13.
- Siesjö BK, Hu B, Kristian T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? J Cereb Blood Flow Metab. 1999b;19:19-26.
- Siesjö BK. Acid-base homeostasis in the brain: physiology, chemistry, and neurochemical pathology. In: Kogure K, Hossmann K-A, Siesjö BK, Weld FA. (Eds), Progress in brain research. Vol. 63: molecular mechanisms of ischemic brain damage. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1985;63:121-54.
- Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM, Bernardi G. Effect of smoking on cerebrovascular reactivity. J Cereb Blood Flow Metab. 1996;16:746-749.
- Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, Matteis M, Passarelli F, Troisi E, Caltagirone C. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. JAMA. 2000;283(16):2122-7.
- Smith JJ, Ebert TJ. General response to orthostatic stress. In: Smith JJ. (Ed), Circulatory response to the upright posture. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990:1-46.
- Soize S, Tisserand M, Charron S, Turc G, Ben Hassen W, Labeyrie MA, Legrand L, Mas JL, Pierot L, Meder JF, Baron JC, Oppenheim C. How sustained is 24-hour diffusion-weighted imaging lesion reversal? Serial magnetic resonance imaging in a patient cohort thrombolyzed within 4.5 hours of stroke onset. Stroke. 2015;46:704-10. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.008322.

- Soriano SG, Lipton SA, Wang YMF, Xiao M, Springer TA, Gutierrezramos JC, Hickey PR. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia -Reperfusion injury. *Ann Neurol.* 1996;39:618-24.
- Sorteberg W. Cerebral artery blood velocity and cerebral blood flow. In: Newell DW, Aaslid R. (Eds), Transcranial Doppler. Raven, New York, 1992:57-66.
- Speth RC, Harik SI. Angiotensin II receptor binding sites in brain microvessels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:6340-3.
- St Lawrence KS, Ye FQ, Lewis BK, Weinberger DR, Frank JA, McLaughlin AC. Effects of indomethacin on cerebral blood flow at rest and during hypercapnia: an arterial spin tagging study in humans. J Magn Reson Imaging. 2002;15:628-35.
- Stefanovic B, Bosetti F, Silva AC. Modulatory role of cyclooxygenase-2 in cerebrovascular coupling. Neuroimage. 2006;32:23-32.
- Stejskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a timedependent field gradient. Journal of Chemical Physics. 1965;42:288-92.
- Strangman G, Boas DA, Sutton JP. Non-invasive neuroimaging using near-infrared light. Biol Psychiatry. 2002;52:679-93.
- Stroemer RP, Rothwell NJ. Cortical protection by localized striatal injection of IL-1ra following cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:597-604.
- Sturzenegger M, Newell DW, Aaslid R. Visually evoked blood flow response assessed by simultaneous two-channel transcranial Doppler using flow velocity averaging. Stroke. 1996;27:2256-61.
- Suval WD, Duran WN, Boric MP, Hobson RW 3rd, Berendsen PB, Ritter AB. Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. Am J Surg. 1987;154:211-5.
- Symon L, Branston NM, Strong AJ, and Hope TD. The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. J Clin Pathol. 1977;30(Suppl. 11):149-54.
- Szabó K, Lakó É, Juhász T, Rosengarten B, Csiba L, Oáh L. Hypocapnia induced vasoconstriction significantly inhibits the neurovascular coupling in humans. J Neurol Sci. 2011;309:58-62. doi: 10.1016/j.jns.2011.07.026.
- Szabó K, Rosengarten B, Juhász T, Lakó É, Csiba L, Oláh L. Effect of non-steroid antiinflammatory drugs on neurovascular coupling in humans. J Neurol Sci. 2014;336:227-231.
- Szapáry L. Agyi keringési zavarok. (Cerebrovascularis betegségek). http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0094 neurologia hu/ch07s02.html
- Takahashi N, Imai S, Saito F, Suzuki K, Tanaka H, Kushiro T, Yagi H, Hirayama A. Alcohol produces imbalance of adrenal and neuronal sympathetic activity in patients with alcohol-induced neurocardiogenic syncope. Circ J. 2008;72:979-85.
- Talagala SL, Noll DC. Functional MRI using steady-state arterial water labeling. Magn Reson Med. 1998;39:179-183.
- Taleb M, Lövblad KO, El-Koussy M, Guzman R, Bassetti C, Arnold M, Oswald H, Remonda L, Schroth G. Reperfusion demonstrated by apparent diffusion coefficient mapping after local intra-arterial thrombolysis for ischaemic stroke. Neuroradiology. 2001;43:591-4.
- Tamura A, Asano T, Sano K. Correlation between rCBF and histological changes following temporary middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1980;11:487-93.
- Tateoka K, Iwasaki YK, Ono T, Kobayashi Y, Katoh T, Takano T. A new alcohol provocation head up tilt protocol in the patients with alcohol-related syncope. Europace. 2007;9:220-4.

- Terborg C, Bramer S, Weiller C, Rother J. Short-term effect of cigarette smoking on CO₂induced vasomotor reactivity in man: a study with near-infrared spectroscopy and tanscranial Doppler sonography. J Neurol Sci. 2002;205:15-20.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N Engl J Med. 1995;333:1581-7.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. Stroke. 1997;28:2109-18.
- Thomalla G, Rossbach P, Rosenkranz M, Siemonsen S, Krützelmann A, Fiehler J, Gerloff C. Negative fluid-attenuated inversion recovery imaging identifies acute ischemic stroke at 3 hours or less. Ann Neurol. 2009;65:724-32.
- Thulborn KR, Gindin TS, Davis D, Erb P. Comprehensive MR imaging protocol for stroke management: tissue sodium concentration as a measure of tissue viability in nonhuman primate studies and in clinical studies. Radiology. 1999;213:156-66.
- Tiecks FP, Lam AM, Aaslid R, Newell DW. Comparison of static and dynamic cerebral autoregulation measurements. Stroke. 1995;26:1014-9.
- Tolentino NJ, Wierenga CE, Hall S, Tapert SF, Paulus MP, Liu TT, Smith TL, Schuckit MA. Alcohol effects on cerebral blood flow in subjects with low and high responses to alcohol. Alcohol Clin Exp Res. 2011;35:1034-40. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01435.x
- Tomita M, Kanno I, Hamel E. Brain Activation and CBF Control. Elsevier, Amsterdam, 2002.
- Tomita M. Pathophysiology of brain edema. In: Kalimo H. (Ed.), Cerebrovascular Diseases, ISN Neuropath, Basel, Switzerland, 2005:33-46.
- Topcuoglu MA. Transcranial Doppler ultrasound in neurovascular diseases: diagnostic and therapeutic aspects. J Neurochem. 2012;123 Suppl 2:39-51. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07942.x.
- Tortora F, Cirillo M, Ferrara M, Manto A, Briganti F, Cirillo S. DWI Reversibility after Intra-Arterial Thrombolysis. A Case Report and Literature Review. Neuroradiol J. 2010;23:752-62.
- Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. Circulation. 2002;105:1155-7.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization of AT2 angiotensin II receptors in rat anterior cerebral arteries. Am J Physiol. 1991;261:H667-70.
- Tuor UI, Kozlowski P, Del Bigio MR, Ramjiawan B, Su S, Malisza K, Saunders JK Diffusion- and T2-weighted increases in magnetic resonance images of immature brain during hypoxiaischemia: transient reversal posthypoxia. Exp Neurol. 1998;150:321-328
- Uhl F, Franzen P, Podreka I, Steiner M, Deecke L. Increased regional cerebral blood flow in inferior occipital cortex and cerebellum of early blind humans. Neurosci Lett. 1993;150:162-4.
- van Kooten F, Ciabattoni G, Koudstaal PJ, Dippel DW, Patrono C. Increased platelet activation in the chronic phase after cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage. Stroke. 1999;30:546-9.
- van Lookeren Campagne M, Thomas GR, Thibodeaux H, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG, van Bruggen N. Secondary reduction in the apparent diffusion coefficient of water, increase in cerebral blood volume, and delayed neuronal death after middle cerebral artery occlusion and early reperfusion in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1999;19:1354-64.
- Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. Medical Science Monitor. 2001;7:1075-85.

- Varga DP, Puskás T, Menyhárt Á, Hertelendy P, Zölei-Szénási D, Tóth R, Ivánkovits-Kiss O, Bari F, Farkas E. Contribution of prostanoid signaling to the evolution of spreading depolarization and the associated cerebral blood flow response. Sci Rep. 2016;6:31402. doi: 10.1038/srep31402.
- Vastagh I, Pozsár M, Folyovich A, Debreczeni R, Pálvölgyi L, Bereczki D, Szirmai I. [Intracerebral steal after acetazolamide administration]. Ideggyogy Sz. 2008;61:168-73.
- Vernieri F, Pasqualetti P, Passarelli F, Rossini P. M, Silvestrini M. Outcome of carotid artery occlusion is predicted by cerebrovascular reactivity. Stroke. 1999;30:593-8.
- Villringer A. Understanding functional neuroimaging methods based on neurovascular coupling. Adv Exp Med Biol. 1997;413:177-93.
- Viski S, Orosz M, Czuriga-Kovács KR, Magyar MT, Csiba L, Oláh L. The acute effects of alcohol on cerebral hemodynamic changes induced by the head-up tilt test in healthy subjects. J Neurol Sci. 2016;368:113-20. doi:10.1016/j.jns.2016.06.060.
- Vo KD, Lin W, Hsu CY, Lee Y, Lee JM. MR imaging enhancement patterns as predictors of hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. AJNR Am J Neuroradiol. 2003;24:674-9.
- Wagerle LC, Degiulio PA. Indomethacin-sensitive CO₂ reactivity of cerebral arterioles is restored by vasodilator prostaglandin. Am J Physiol. 1994;266:H1332-8.
- Walz B, Zimmermann C, Bottger S, Haberl RL. Prognosis of patients after hemicraniectomy in malignant middle cerebral artery infarction. J Neurol. 2002;249:1183-90.
- Wanet-Defalque MC, Veraart C, De Volder A, Metz R, Michel C, Dooms G, Goffinet A. High metabolic activity in the visual cortex of early blind human subjects. Brain Res. 1988;446:369-73.
- Wang Q, Bryowsky J, Minshall RD, Pelligrino DA. Possible obligatory functions of cyclic nucleotides in hypercapnia-induced cerebral vasodilation in adult rats. Am J Physiol. 1999;276:H480-7.
- Wang Q, Paulson OB, Lassen NA. Indomethacin abolishes cerebral blood flow increase in response to acetazolamide-induced extracellular acidosis: a mechanism for its effect on hypercapnia? J Cereb Blood Flow Metab. 1993;13:724-7.
- Wang XK, Feuerstein GZ. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. J Neurotrauma. 1995;12:825-832.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Walker M. Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. JAMA. 1995;274:155-60.
- Warach S, Gaa J, Siewert B, Wielopolski P, Edelman RR. Acute human stroke studied by whole brain echo planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol.* 1995,37:231-41.
- Warach S, Latour LL. Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. Stroke. 2004;35[11 Suppl 1]:2659-61.
- Watanabe O, Bremer AM, West CR. Experimental regional cerebral ischemia in the middle cerebral artery territory in primates. I. Angio-anatomy and description of an experimental model with selective embolization of the internal carotid artery bifurcation. Stroke. 1977;8:61-70.
- Wennmalm A, Carlsson I, Edlund A, Eriksson S, Kaijser L, Nowak J. Central and peripheral haemodynamic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in man. Arch Toxicol Suppl. 1984;7:350-9.
- Wennmalm A, Eriksson S, Wahren J. Effect of indomethacin on basal and carbon dioxide stimulated cerebral blood flow in man. Clin Physiol. 1981;1:227-34.
- Wennmalm A. Effect of cigarette smoking on basal and carbon dioxide stimulated cerebral blood flow in man. Clin Physiol. 1982;2:529-35.

- Werner C, Hoffmann WE, Kochs E, Rabito SF, Miletich DJ. Captopril improves neurologic outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. Stroke. 1991;22:910-4.
- Widmark EMP. Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtsmedizinischen Alkoholbestimmung. Urban und Schwarzenberg, Berlin, 1932:1-140.
- Wienhard K. Measurement of glucose consumption using [18F] fluorodeoxyglucose. Methods. 2000;27:218-25.
- Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. J Physiol. 2014;592:841-59. doi: 10.1113/jphysiol.2013.268953.
- Wolf ME. Functional TCD: regulation of cerebral hemodynamics--cerebral autoregulation, vasomotor reactivity, and neurovascular coupling. Front Neurol Neurosci. 2015;36:40-56. doi: 10.1159/000366236.
- Xu HL, Pelligrino DA. ATP release and hydrolysis contribute to rat pial arteriolar dilatation elicited by neuronal activation. Exp Physiol. 2007;92:647-51.
- Yabuuchi F, Takahashi M, Aritake K, Fujimoto M, Ito H, Tsuzaki, M, Akai T, Yamaguchi M, Hayashi S, Nishino Y, Brautigam M. Post-stroke treatment with imidapril reduces learning deficits with less formation of brain oedema in a stroke-prone substrain of spontaneously hypertensive rats. Fund. Clin. Pharmacol. 1999;13:475-83.
- Yamashita K, Kobayashi S, Yamaguchi S. Cerebral blood flow and cessation of cigarette smoking in healthy volunteers. Intern Med. 2000;39:891-3.
- Yang C, Gao Y, Greaves DK, Villar R, Beltrame T, Fraser KS, Hughson RL. Prior headdown tilt does not impair the cerebrovascular response to head-up tilt. J Appl Physiol. 2015;118:1356-63. doi:10.1152/japplphysiol.00871.2014
- Yang G, Iadecola C. Activation of cerebellar climbing fibers increases cerebellar blood flow: role of glutamate receptors, nitric oxide, and cGMP. Stroke. 1998;29:499-507.
- Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke. 1994;25:1658-65.
- Yang GY, Schielke GP, Gong C, Mao Y, Ge HL, Liu XH, Betz AL. Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1 beta converting enzyme deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab. 1999;19:1109-17.
- Yonai Y, Boms N, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L, Oláh L. Acetazolamide-induced vasodilation does not inhibit the visually evoked flow response. J Cereb Blood Flow Metab. 2010;30:516-21.
- Zádori D, Klivényi P, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. J Neurol Sci. 2012;322:187-91. doi: 10.1016/j.jns.2012.06.004.
- Zaidi A, Benitez D, Gaydecki PA, Vohra A, Fitzpatrick AP. Haemodynamic effects of increasing angle of head up tilt. Heart. 2000;83:181-4.
- Zarow GJ, Graham SH, Mintorovitch J, Chen J, Yang G, Weinstein PR. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging during brief focal cerebral ischemia and early reperfusion: evolution of delayed infarction in rats. Neurol Res. 1995;17:449-54.
- Zeller JA, Tschoepe D, Kessler C. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. Thromb Haemost. 1999;81:373-7.
- Zhang Q, Strangman GE, Ganis G. Adaptive filtering to reduce global interference in noninvasive NIRS measures of brain activation: how well and when does it work? Neuroimage. 2009;45:788-94.

- Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurol Sci. 1994;125:3-10.
- Zhu J, Song W, Li L, Fan X. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. Molecular Brain. 2016;9:30. DOI:10.1186/s13041-016-0211-9
- Zimmermann C, Haberl RL. L-arginine improves diminished cerebral CO₂ reactivity in patients. Stroke. 2003;34:643-647.
- Zülch K-J. The Cerebral Infarct. Pathology, Pathogenesis, and Computed Tomography, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 1985.

8. KÖZLEMÉNYEK, TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

8.1. AZ ÉRTKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- <u>Oláh L</u>, Wecker S, Hoehn M. Secondary deterioration of apparent diffusion coefficient after 1-hour transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;10:1474-1482. IF: 5.926
- Paschen W, <u>Oláh L</u>, Mies G. Effect of transient focal ischemia of mouse brain on energy state and NAD levels: no evidence that NAD depletion plays a major role in secondary disturbances of energy metabolism. J Neurochem. 2000;75:1675-80. IF: 4.9
- 3. <u>Oláh L</u>, Wecker S, Hoehn M. Relationship of ADC changes and metabolic disturbances after 1 hour focal cerebral ischemia and at different reperfusion phases in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2001;21:430-439. IF: 5.477
- Walther T, <u>Oláh L</u>, Harms C, Maul B, Bader M, Hortnagl H, Schultheiss HP, Mies G. Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. FASEB J. 2002;16:169-76. IF: 7.252 (megosztott elsőszerzős közlemény)
- <u>Oláh L</u>, Raiter Y, Candale C, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L. Visually evoked cerebral vasomotor response in smoking and nonsmoking young adults, investigated by functional transcranial Doppler. Nicotine Tob Res. 2008;10:353-8. IF: 2.539
- Boms N, Yonai Y, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L, <u>Oláh L</u>. Effect of smoking cessation on visually evoked cerebral blood flow response in healthy volunteers. J Vasc Res. 2010;47:214-20. IF: 2.752
- Yonai Y, Boms N, Molnár S, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L, <u>Oláh L</u>. Acetazolamide-induced vasodilation does not inhibit the visually evoked flow response. J Cereb Blood Flow Metab. 2010;30:516-21. IF: 4.522
- Szabó K, Lako É, Juhasz T, Rosengarten B, Csiba L, <u>Oláh L</u>. Hypocapnia induced vasoconstriction significantly inhibits the neurovascular coupling in humans. J Neurol Sci. 2011;309:58-62. IF: 2.353
- Szabó K, Rosengarten B, Juhász T, Lakó É, Csiba L, <u>Oláh L</u>. Effect of non-steroid antiinflammatory drugs on neurovascular coupling in humans. J Neurol Sci. 2014;336:227-31. IF:2.262
- Viski S, Orgován D, Szabó K, Rosengarten B, Csiba L, <u>Oláh L</u>. Effect of reading on blood flow changes in the posterior cerebral artery in early blind and sighted people--A transcranial Doppler study. J Neurol Sci. 2016;363:132-9. doi:10.1016/j.jns.2016.02.050. IF: 2.126
- Viski S, Orosz M, Czuriga-Kovács KR, Magyar MT, Csiba L, <u>Oláh L</u>. The acute effects of alcohol on cerebral hemodynamic changes induced by the head-up tilt test in healthy subjects. J Neurol Sci. 2016;368:113-20. doi:10.1016/j.jns.2016.06.060. IF: 2.126

Az értekezéshez felhasznált közlemények impakt faktora 42.447, az azokra adott összes citáció 315, melyből 273 független idézet.

8.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- 1. <u>Oláh L</u>, Fülesdi B, Valikovics A, Csiba L, Olvasztó S, Bánfi Cs, Kozlovszky B. Alsóvégtagi verőérszűkület miatt operált betegek carotis-Doppler vizsgálatával szerzett tapasztalataink. **Ideggy Szle.** 1993;46:322-5.
- 2. Pallagi E, <u>Oláh L</u>. A cluster fejfájás. Orv Hetil. 1994;135:1515-9.
- **3.** Valikovics A, <u>Oláh L</u>, Fülesdi B, Munkácsy Cs, Csiba L. A vazoreaktivitás vizsgálata egészséges személyek esetében transcranialis és carotis Dopplerrel. **Ideggy Szle.** 1996;49:30-5.
- Kappelmayer J, Berecki D, Misz M, <u>Oláh L</u>, Fekete I, Csiba L, Blaskó Gy. Monocytes express tissue factor in young patients with cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. 1998;8:235-9. IF: 1.288
- <u>Oláh L</u>, Misz M, Bereczki D, Fekete I, Bordánné JE, Takács EI. Kis dózisú acetilszalicilát hatásosan gátolja a thrombocyta-aggregációt ischaemiás stroke után. Orv Hetil. 1996;137:455-9.
- Misz M, <u>Oláh L</u>, Kappelmayer J, Blaskó Gy, Udvardy M, Fekete I, Csépány T, Ajzner É, Csiba L. Haemostasis eltérések ischaemiás strokeban. Orv Hetil. 1998;139:2503-7.
- Fülesdi B, Valikovics A, Orosz L, <u>Oláh L</u>, Limburg M, Dink L, Káposzta Z, Csiba L. A cerebrovascularis reaktivitás vizsgálata az arteria carotisok tünetmentes és tünetet okozó atheroscleroticus laesióiban szenvedő betegekben. Orv Hetil. 1998;139:623-8.
- 8. Valikovics A, <u>Oláh L</u>, Fülesdi B, Káposzta Z, Ficzere A, Bereczki D, Csiba L. Cerebrovascular reactivity measured by transcranial Doppler in migraine. Headache. 1996;36:323-8. IF: 1.566
- **9.** Ficzere A, <u>Oláh L</u>. Egyéves cilazapril kezelés hatása hypertóniás betegek agyi véráramlási paramétereire. **Ideggy Szle.** 1998;51:94-9.
- 10. Grüne M, van Dorsten FA, Schwindt W, <u>Oláh L</u>, Hoehn M. Quantitative T*(2) and T'(2) maps during reversible focal cerebral ischemia in rats: separation of blood oxygenation from nonsusceptibility-based contributions. Magn Reson Med. 1999;42:1027-32. IF: 3.757
- Maeda K, Mies G, <u>Oláh L</u>, Hossmann KA. Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [14C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:10-4. IF: 5.926
- Franke C, van Dorsten FA, <u>Oláh L</u>, Schwindt W, Hoehn M. Arterial spin tagging perfusion imaging of rat brain. Dependency on magnetic field strength. Magnetic Resonance Imaging 2000;18:1109-13. IF: 1.452
- 13. <u>Oláh L</u>, Valikovics A, Bereczki D, Fülesdi B, Munkácsy Cs, Csiba L. Gender-related differences in acetazolamide-induced cerebral vasodilatory response: a transcranial Doppler study. J Neuroimaging. 2000;10:151-6. IF: 0.942
- 14. <u>Oláh L</u>, Franke C, Schwindt W, Hoehn M. CO(2) reactivity measured by perfusion MRI during transient focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.** 2000;31:2236-44. **IF:6.008**
- Trapp T, <u>Oláh L</u>, Holker I, Besselmann M, Tiesler C, Maeda K, Hossmann KA. Gtpase rhob: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. Molecular and Cellular Neuroscience. 2001;17:883-94. IF: 5.446

- 16. <u>Oláh L</u>, Misz M, Kappelmayer J, Ajzner É, Csépány T, Fekete I, Bereczki D, Blaskó Gy, Csiba L. Natural coagulation inhibitor proteins in young patients with cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. 2001;12:291-7. IF: 1.665
- 17. Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, <u>Oláh L</u>, Nairn AC, Proud CG, Paschen W. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. J Neurochem. 2001;78:779-87. IF: 4.834
- 18. Fülesdi B, Limburg M, <u>Oláh L</u>, Bereczki D, Csiba L, Kollár J. Lack of gender difference in acetazolamide-induced cerebral vasomotor reactivity in patients suffering from type-1 diabetes mellitus. Acta Diabetol. 2001;38:107-12. IF: 0.817
- **19.** van Dorsten FA, <u>Oláh L</u>, Schwindt W, Grüne M, Uhlenkuken U, Pillekamp F, Hossmann KA, Hoehn M. Dynamic changes of ADC, perfusion, and NMR relaxation parameters in transient focal ischemia of rat brain. **Magn Reson Med.** 2002;47:97-104. **IF: 3.250**
- 20. Daoud R, Mies G, Smialowska A, <u>Oláh L</u>, Hossmann KA, Stamm S. Ischemia induces a translocation of the splicing factor tra2-beta 1 and changes alternative splicing patterns in the brain. J Neurosci. 2002;22:5889-99. IF: 8.045
- 21. Mengesdorf T, Althausen S, Mies G, <u>Oláh L</u>, Paschen W. Phosphorylation state, solubility, and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in transient focal ischemia in mouse brain. Neurochem Res. 2002;27:477-84. IF: 1.672
- 22. <u>Oláh L</u>, Csépány T, Bereczky Z, Kerényi A, Misz M, Kappelmayer J, Csiba L. Természetes antikoaguláns fehérjék szerepe az ischaemiás stroke akut fázisában. Ideggy Szle. 2005;20;58:33-9.
- **23.** <u>Oláh L.</u> Cerebrovaszkuláris betegségek megelőzése. Háziorvosi Továbbképző Szemle. 2009;14:394-8.
- 24. <u>Oláh L.</u> A transcranialis Doppler szerepe a cerebralis vasodilatatiós képesség meghatározásában. **Orvostudományi Értesítő.** 2009;82:79-82.
- 25. <u>ACTIVE Investigators</u>., Connolly SJ, Pogue J, Hart RG, Hohnloser SH, Pfeffer M, Chrolavicius S, Yusuf S. Effect of clopidogrel added to aspirin in patients with atrial fibrillation. N Engl J Med. 2009;360:2066-78. IF:47.05
- 26. Kovács KR, Szekeres CC, Bajkó Z, Csapó K, Molnár S, <u>Oláh L</u>, Magyar MT, Bereczki D, Kardos L, Soltész P, Bojtor AB, Csiba L. Cerebro- and cardiovascular reactivity and neuropsychological performance in hypertensive patients. J Neurol Sci. 2010;299:120-5. IF:2.167
- 27. Csongrádi É, Nagy B Jr, Fülöp T, Varga Z, Karanyi Z, Magyar MT, <u>Oláh L</u>, Papp M, Facskó A, Kappelmayer J, Paragh G, Káplár M. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. Thromb Haemost. 2011;106:683-92. IF:5.044
- 28. Soltész P, Laczik R, Veres K, Kerekes G, Szomják E, Magyar MT, Fekete I, Molnár S, Fekete K, <u>Oláh L</u>, Csiba L. Perifériás érbetegek és stroke-ot elszenvedett betegek komplex angiológiai vizsgálata és gondozási folyamata. Az Auguszta Vascularis Program első eredményei. Érbetegségek. 2012;2:31-38.
- **29.** Szabó KJ, Ádány R, Balla J, Balogh Z, Boda Z, Édes I, Fekete I, Káplár M, Mátyus J, <u>Oláh L</u>, Olvasztó S, Paragh G, Páll D, Pfliegler G, Vajda G, Zeher M, Csiba L. Újabb

ismeretek a különböző vascularis kórképek megelőzésében, diagnosztikájában és terápiájában. **Orv Hetil.** 2012;153:483-98.

- 30. Léránt B, Christina S, Kovács KR, <u>Oláh L</u>, Kardos L, Csiba L. Morphological, hemodynamic and stiffness changes in arteries of young smokers. Perspectives in Medicine. 2012;1:152-155.
- 31. Léránt B, Christina S, <u>Oláh L</u>, Kardos L, Csiba L. Az érfalvastagság és érfalmerevség összehasonlító vizsgálata dohányzó és nemdohányzó egyetemisták körében. Ideggy Szle. 2012;65:121-6. IF: 0.348
- 32. Bajkó Z, Szekeres C, Kovács KR, Csapó K, Molnár S, Soltész P, Nyitrai E, Magyar MT, <u>Oláh L</u>, Bereczki D, Csiba L. Anxiety, depression and autonomic nervous system dysfunction in hypertension. J. Neurol Sci. 2012;317:112-6. IF:2.243
- **33.** Mezei Z, <u>Oláh L</u>, Kardos L, Kovács RK, Csiba L, Csépány T. Cerebrovascular hemodynamic changes in multiple sclerosis patients during head-up tilt table test: effect of high-dose intravenous steroid treatment. J Neurol. 2013;260:2335-42. IF: 3.841
- 34. Kovács KR, Bajkó Z, Szekeres CC, Csapó K, <u>Oláh L</u>, Magyar MT, Molnár S, Czuriga D, Kardos L, Buraine AB, Bereczki D, Soltész P, Csiba L. Elevated LDL-C combined with hypertension worsens subclinical vascular impairment and cognitive function. Journal of the American Society of Hypertension. 2014;8:550-60. IF: 2.606
- 35. Káplár M, Sweni S, Kulcsár J, Cogoi B, Esze R, Somodi S, Papp M, <u>Oláh L</u>, Magyar MT, Szabó K, Czuriga-Kovács KR, Hársfalvi J, Paragh G. Mannose-binding lectin levels and carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients. J Diabetes Res. 2016;2016:8132925. doi: 10.1155/2016/8132925. IF: 2.431
- 36. Malojcic B, Giannakopoulos P, Sorond FA, Azevedo E, Diomedi M, Oblak JP, Carraro N, Boban M, <u>Oláh L</u>, Schreiber SJ, Pavlovic A, Garami Z, Bornstein NM, Rosengarten B. Ultrasound and dynamic functional imaging in vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease. BMC Med. 2017;15(1):27. IF:8.005

8.3. FŐBB TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Összes közleményre vonatkozó adatok <u>(a sokszerzős közlemény</u>	<u>nélkül)</u>
Összes közlemény száma:	46
Összes hivatkozás száma:	751
Független hivatkozások száma:	652
Összesített impakt faktor:	115.7
Első és utolsó szerzőségű közleményekre vollatkozo adatok	
erső és utorső szerzőségű köztemenyek szama (megősztött erső	20
szerzőségű közlemenyi is beleszámítvá).	20
Elso es uloiso szerzosegu közlemenyekte adolt összes nivátkozás	
szama (megosztott elso szerzosegu közlemenyt is	202
	293
Elso es utolso szerzosegu közlemenyekre adott fuggetlen	
hivatkozasok szama (megosztott első szerzőségű közleményt is	
beleszámítva):	253
Első és utolsó szerzőségű közlemények impakt faktora	
(megosztott első szerzőségű közleményt is beleszámítva):	46.162
Az értekezéshez felhasznált közleményekre vonatkozó adatok	
Az értekezéshez felhasznált közlemények száma:	11
Az értekezéshez felhasznált közleményekre adott összes	
hivatkozás száma:	315
Az értekezéshez felhasznált közleményekre adott független	
hivatkozások száma:	273
Az értekezéshez felhasznált közlemények impakt faktora:	42.447
· · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
A PhD értekezésben nem szereplő cikkekre vonatkozó adatok	
A PhD értekezésben nem szereplő közlemények száma:	36
A PhD értekezésben nem szereplő közleményekre adott összes	
hivatkozás száma:	671
A PhD értekezésben nem szereplő közleményekre adott független	
hivatkozások száma:	583
A PhD értekezésben nem szereplő közlemények impakt faktora:	104.231
Hirsch index:	15

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk ²	47			
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		31	<mark>651</mark>	752
szakcikk, hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű		8	5	5
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³		1	444	573
összefoglaló közlemény		6	7	7
rövid közlemény		1	24	30
II. Könyv	1			
a) Szakkönyv, kézikönyv	1			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		1	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	8			
idegen nyelvű		2	0	0
magyar nyelvű		2	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		4	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		5	0	0
Tudományos közlemények összesen (IIV.)		51	1131	1367
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	56		1131	1367
V. További tudományos művek	0			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
VI. Idézett absztraktok ⁵	0		0	0

Oláh László tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2017.04.26.)

Idézettség száma ¹		 1131	1367
Hirsch index ⁶	15	 	
g index ⁶	37	 	

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős folyóiratcikkek száma ² *	11	155
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ² *	8	44
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	22	709
Az utolsó 10 év (2007-2017) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	21	707
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	573	41,92%
ldézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS/Scopus rendszerben	18	
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.

Megjegyzések:

¹ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli - WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Csiba László Professzor Úrnak, aki tudományos munkámat nemcsak intézetvezetőként és munkatársként, de barátként is támogatta. Hálásan köszönöm Dr. Fekete István Professzor Úrnak, hogy az ideg- és elmegyógyászati oktatás során felkeltette az érdeklődésemet a neurológia iránt, megtanította a neurológia alapjait, s elindított a neurológusi pályán.

Köszönet illeti külföldi mentoraimat, akik Kölnben, a Max-Planck-Intézetben segítették a munkámat. Az ottani tudományos munkám koordinálásáért Hossmann Professzor Úrnak, az MR vizsgálatok során nyújtott támogatásért Hoehn Professzor Úrnak, míg a biokémiai kísérletekben, állatkísérletekben nyújtott segítségért Mies és Paschen Professzor Uraknak tartozom köszönettel. Külön hálás vagyok barátomnak és munkatársamnak Dr. Wolfram Schwindtnek, akivel a legtöbb közös kísérletet végeztem, s aki a beilleszkedést és a kinti tartózkodásomat megkönnyítette. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Bernhard Rosengarten Professzor Úrnak, aki a funkcionális TCD vizsgálatok elindításakor volt segítségemre.

Közvetlen főnökeimen túl sokat tanultam Molnár Professzor Úrtól, Hegedűs Professzornőtől, Mechler Professzor Úrtól, Bereczki Professzor Úrtól, Fülesdi Professzor Úrtól, Diószeghy Tanár Úrtól, Csépány Tanárnőtől és Vámosi Adjunktus Úrtól. Köszönöm a vizsgálatokban velem dolgozó, Valikovics Tanár Úrnak, Molnár Sándor Főorvos Úrnak hogy munkám során mindig támogattak. Személyükben nemcsak munkatársakra, de barátokra is leltem.

Köszönettel tartozom a Neurológiai Klinika Doppler munkacsoportjának. Külön hálával tartozom Borók Józsefnének, aki nemcsak közvetlen segítséget adott a kísérletek technikai lebonyolítása során, de komoly terhet vett le a vállunkról a mindennapi rutin vizsgálatok lelkiismeretes, precíz végzésével. Az elektrofiziológiai labor munkatársai közül Paluskáné Peterman Tündének, Kathi Lászlónénak és Oláh Katalinnak köszönöm a segítségét.

Ki kell emelnem a vizsgálatokban résztvevő önkénteseket, s külön a vak résztvevőket, akik a különféle nehézségek ellenére mindig szívesen vállalkoztak a sokszor meglehetősen hosszú és fárasztó vizsgálatokra. Köszönöm nekik az önzetlen segítségnyújtást.

Köszönöm a mindenkori kollégáimnak és a TDK munkát végző hallgatóknak hogy segítettek a mindennapi munkában és ösztönöztek a kísérletek végzésekor.

Hálával és szomorú szívvel gondolok arra a sok-sok kísérleti állatra, melyet Kölnben operáltunk. Bízom benne, hogy haláluk nem volt értelmetlen.

Vizsgálataink egy részét (Az akut alkoholfogyasztás hatása az agyi hemodinamikai változásokra; Látó és vak személyek PCA-ban mérhető áramlási válasza) a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_NAP_13-1-2013-0001) támogatta.

Végül, de nem utolsósorban nagyon köszönöm feleségemnek, Dr. Pallagi Edinának, hogy végigkísért eddigi utamon, s kitartott mellettem akkor is, amikor heteken át több időt töltöttem a számítógéppel mint vele, s aki három gyönyörű gyermekkel ajándékozott meg. Nekik, név szerint Marcinak, Istinek és Áginak is nagyon köszönöm, hogy elviselték és tolerálták, amikor a szabadidőm őket illető részét elloptam, remélem megbocsátják ezt nekem. Nem tudok elég hálás lenni szüleimnek, akik szeretetükkel mindig segítettek és támogattak.