

MTA Doktori Értekezés

**AZ AGYKÉRGI TERJEDŐ DEPOLARIZÁCIÓ KÓRÉLETTANI
JELENTŐSÉGE**

Dr. Farkas Eszter



**Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet**

2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés.....	5
2.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció idegélettani és farmakológiai jellemzői	6
2.2. Az agykérgi terjedő depolarizációval összefüggő metabolikus és hemodinamikai változások, a vérátáramlási válasz szabályozása	8
2.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció klinikai jelentősége	9
2.4. Az életkor jelentősége az agykérgi terjedő depolarizációra nézve	11
2.5. Módszertani megközelítés	11
3. Célkitűzések	13
4. Optikai elven alapuló, kísérletes, agyi képalkotási módszerek kidolgozása az agykérgi terjedő depolarizáció megjelenítésére	13
4.1. Az ideszöveti potenciálváltozások nyomon követése feszültség-függő festékkel	14
4.1.1. <i>In vitro</i> csirke retina preparátum	14
4.1.2. Zárt koponyaablak alatt patkányon.....	17
4.2. A hemodinamikai változók szinkron rögzítése	22
4.2.1. Az agyi vérátáramlás képi megjelenítése lézer-folt interferencia kontraszt analízissel: duális képalkotás.....	24
4.2.2. Az agyi vérvolumen és hemoglobin deszaturáció lokális változásainak nyomon követése: multi-modális képalkotás	28
4.3. Az agyszöveti pH változásainak megjelenítése pH-függő festékkel	37
5. Az iszkémiás agykéregben kialakuló agykérgi terjedő depolarizáció és a csatolt keringési és metabolikus változások jellegzetességei, kórélettani jelentősége	44
5.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció térbeli mintázata iszkémiás agykéregben: permanens, fokális előagyi iszkémia	44
5.2. Az agykérgi terjedő depolarizációval járó hemodinamikai változások: permanens multifokális előagyi iszkémia.....	50
5.3. A terjedő iszkémiás jelensége: permanens globális előagyi iszkémia	62
5.4. Az agykérgi terjedő depolarizációval járó szöveti acidózis: tranziens globális előagyi iszkémia és reperfúzió.....	68
6. Az agykérgi terjedő depolarizációhoz csatolt agyi vérátáramlási változás mediátorai, az agyi iszkémia hatása	74
6.1. Az értágító prosztaglandionok szerepe.....	75
6.2. Az agyszövet kémhatásának szerepe	83
6.3. A kálium extracelluláris felszaporodásának szerepe.....	88
6.4. Összefoglalás.....	102
7. Az életkor hatása az agykérgi terjedő depolarizáció kialakulására, lefutására	103

7.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció kiválthatósági küszöbének életkorfüggése	104
7.2. Az agykérgi terjedő depolarizáció az idősödő, krónikusan hipoperfundált agyban	111
7.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció az idős, akut iszkémiának kitett agyban	118
7.3.1. Globális előági iszkémia	118
7.3.2. Fokális előági iszkémia	122
7.4. Az agykérgi terjedő depolarizációhoz csatolt pH változások módosulása az idős agyban	128
8. Összefoglalás, kutatásaink távlatai	132
9. Új megállapítások	139
10. Etikai engedélyek	140
11. Támogatók	140
12. Irodalomjegyzék	141
13. Közleményjegyzék	159
13.1. A dolgozat alapjául szolgáló, válogatott közlemények	159
13.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények	160
13.3. A PhD értekezésben szereplő közlemények	162
13.4. A PhD értekezésben nem szereplő, azt megelőző közlemények	162
14. Szcientometriai paraméterek	163
15. Köszönetnyilvánítás	164

1. Rövidítések jegyzéke

[K ⁺] _e :	káliumion-koncentráció az extracelluláris térben
2VO:	kétoldali <i>arteria carotis communis</i> elzárás (two-vessel occlusion)
20-HETE:	20-hidroxi-eikozatetraénsav
aCSF:	mesterséges cerebrospinális folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AD:	anoxiás depolarizáció (anoxic depolarization)
ANOVA:	varianciaanalízis (analysis of variance)
APG-2:	Asante Potassium Green 2, fluoreszcens K ⁺ indikátor festék
AUC:	görbe alatti terület (area under the curve)
BK csatorna:	nagy konduktanciájú, Ca ²⁺ -aktivált K ⁺ csatorna
CA:	hirtelen szívmegállás (cardiac arrest)
CCA:	<i>arteria carotis communis</i> (common carotid artery)
CBF:	agyi vérátáramlás (cerebral blood flow)
CBV:	agyi térfogat (cerebral blood volume)
CGRP:	kalcitonin génhez rendelt peptid (calcitonin-gene related peptide)
COX:	ciklooxygenáz enzim
DC:	egyenáram (direct current)
DCI:	másodlagos iszkémiás károsodás (delayed cerebral ischemia)
dMCA:	az <i>arteria cerebri media</i> disztális szakasza (distal middle cerebral artery)
dMCAO:	az <i>arteria cerebri media</i> disztális szakaszának elzárása (distal middle cerebral artery occlusion)
DMSO:	dimetil-szulfoxid
EAAT:	glutamát transzporter (excitatory amino acid transporter)
ECoG:	elektrokortikogram (electrocorticogram)
EEG:	elektroencefalogram
EETs:	epoxieikozatriénsavak (epoxyeicosatrienoic acids)
EP ₂ :	2-es típusú prosztaglandin E ₂ receptor
EP ₃ :	3-as típusú prosztaglandin E ₂ receptor
EP ₄ :	4-es típusú prosztaglandin E ₂ receptor
gl:	szürkeszint (gray level)
Hb:	hemoglobin
IOS:	visszaverődő fény (intrinsic optical signal)
iSD:	iszkémia alatt kiváltott terjedő depolarizáció (ischemic spreading depolarization)
LASCA:	lézer-folt interferencia kontraszt analízis (laser speckle contrast analysis)
LDF:	lézer-Doppleres áramlásmérés (laser-Doppler flowmetry)
LFP:	helyi mezőpotenciál (local field potential)
MABP:	artériás középnyomás (mean arterial blood pressure)
MCA:	<i>arteria cerebri media</i> (middle cerebral artery)
MCAO:	<i>arteria cerebri media</i> elzárás (middle cerebral artery occlusion)
MRI:	mágneses rezonancia vizsgálat (magnetic resonance imaging)
NIRS:	közeli infravörös spektroszkópia (near infrared spectroscopy)
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NO:	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
NOS:	nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase)
NR:	neutrálvörös festék (Neutral Red)
PBS:	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline, PBS)

PGE ₂ :	prosztagandin E ₂
PGES:	prosztagandin-E-szintáz
PGF _{2α} :	prosztagandin-F _{2α}
PGs:	prosztagandinok (prostaglandins)
ROI:	kijelölt érdeklődési területet (region of interest)
pH _e :	extracelluláris pH
pH _i :	intracelluláris pH
PLA ₂ :	foszfolipáz A ₂
SAH:	szubarachnoideális vérzés (subarachnoid hemorrhage)
rSD:	visszatérő terjedő depolarizáció (recurrent spreading depolarization)
SHAM:	áloperált
SD:	terjedő depolarizáció (spreading depolarization)
SMC:	simaizomsejt (smooth muscle cell)
stdev:	szórás (standard deviation)
TBI:	zárt koponyasérülés (traumatic brain injury)
TTC:	2,3,5-trifeniltetrazólium-klorid
VGCC:	feszültségfüggő Ca ²⁺ csatorna (voltage-gated Ca ²⁺ channel)

2. Bevezetés

Ma világ szerte az akut agysérülések, köztük a stroke következtében történő elhalálozások jelentetik a második leggyakoribb halálokot, míg a tartós egészségkárosodások okai között a stroke a harmadik, a zárt koponyasérülés a második helyen áll. A hazai statisztikai adatok is ezeket a tendenciákat tükrözik.¹²⁹

Az akut neurológiai kórképek kezelése, gyógyítása jelentős kihívás az orvoslás számára, hiszen a betegek ellátására, a hirtelen fellépő sérülés következményeinek enyhítésére – a hazai és nemzetközi tapasztalatok szerint is – csak órák elteltével kerülhet leghamarabb sor. Az iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegeknek például jellemzően 8-10 %-a kerül betegellátó intézménybe azon a terápiás időablakon belül (4-6 óra), mely a trombolízis terápiát lehetővé teszi, és az időben érkezetteknek is mindössze 30-35 %-a számíthat értékelhető állapotjavulásra a rekanalizációt követően. Az elsődleges sérülés tehát az esetek döntő többségében már visszafordíthatatlan neurológiai károsodással jár. A primér léziót gyakran súlyosbítják másodlagos kórfolyamatok, melyek mérséklése a betegek döntő többségénél a kritikus időablakon túl is reális célkitűzés lehet. Jelenleg azonban a hetékony terápiás lehetőségek száma erősen korlátozott. Hiányosak az ismereteink és a diagnosztikai eszköztár is erősen korlátozott abban a tekintetben, hogy melyik betegcsoport esetében van a másodlagos sérülések kialakulásának legnagyobb kockázata. A betegcsoportok azonosítása segíthet kiválasztani azt a terápiát, amelyre a beteg leginkább reagál, amely az adott betegnél a legjobb eredményt hozhatja. A másodlagos sérülések kockázatának felismerése fontos cél, hiszen az alapozhatja meg az eredményes terápiát.

Az akut agysérülést követő állapotromlás sikeres visszaszorításának alapja azoknak a kórfolyamatoknak a felismerése, amelyek a másodlagos sérülések létrejöttében és kifejeződésében (pl. agyödéma, vazospasmus, hypoperfúzió) központi szereppel bírnak. Az akut agysérülést követő oxidatív és nitrozatív stressz, a gyulladáshoz vezető folyamatok és az excitotoxicitás régóta ismert jelenségek és lehetséges terápiás célpontok. Sajnos az ilyen irányú gyógyszeres kezelések fejlesztése eddig nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket.⁴⁵ Az elmúlt tizenöt évben meghatározó klinikai megfigyelések születtek arra vonatkozóan, hogy a másodlagos sérülések kialakulását döntő mértékben mozdítja elő az agykérgi terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) ismétlődő megjelenése.¹⁶⁴ Az egyre bővülő ismeretanyag alapján a közelmúltban olyan vizsgálatok indultak, melyek az SD gátlását az agysérülések kezelésében hatékony terápiás célpontként tekintik.^{40,203} Legújabbban kezdeményezték az SD-nek mint biomarkernek a monitorozását az idegsebészeti intenzív osztályokon, mert az SD események jellemző mintázata jelzi az agysérülések előrehaladását.^{98,118} Fontolóra vették továbbá, hogy a személyre szabott terápiában figyelembe veszik az SD-k előfordulásának mintázatát is.⁹⁸

A klinikai vizsgálatok hátterét azok a laboratóriumi vizsgálatok képezik, melyek elsőként írták le, majd ismételtelen bizonyították az SD spontán kialakulását és szövetkárosító hatását az iszkémiás stroke és a zárt koponyasérülés (traumatic brain injury, TBI) kísérletes modelljeiben.^{184,270,314,365} Az SD kutatásában a kísérletes eredmények rendszerint megelőzték a klinikai tanulmányokat, ami két fő okra vezethető vissza. Egyrészt a klinikumban az SD regisztrálása jelenleg is csak invazív eljárással, műtéti beavatkozáson átesett betegek esetén kivitelezhető, a rendelkezésre álló módszerek korlátozottak (pl. kraniotómiát követő elektrokortikogram – ECoG – elvezetés); az SD kialakulása és időbeli mintázata megjósolhatatlan; és az akut sérülések kezdeti fázisáról (a beteg klinikai felvétele előtti eseményekről) nem lehet adatot gyűjteni. Ugyanakkor az SD kísérletesen, kontrollált körülmények között kiváltható; invazív módon, több élettani változó monitorozásával pontosan jellemezni lehet; és az SD-ben szerepet játszó mechanizmusok farmakológiai megközelítéssel azonosíthatók.

Ezek a kötöttségek állnak annak hátterében, hogy az 1944-ben, nyulakban felfedezett jelenséget²²⁷ a sérült emberi agyban először ötven évvel később azonosították,²⁵² majd 2002-től kezdték szubdurális ECoG elektródák segítségével szubarachnoideális vérzésen (subarachnoid hemorrhage, SAH) és TBI-n átesett betegekben módszeresen megfigyelni és jellemezni.^{108,165,359} Az

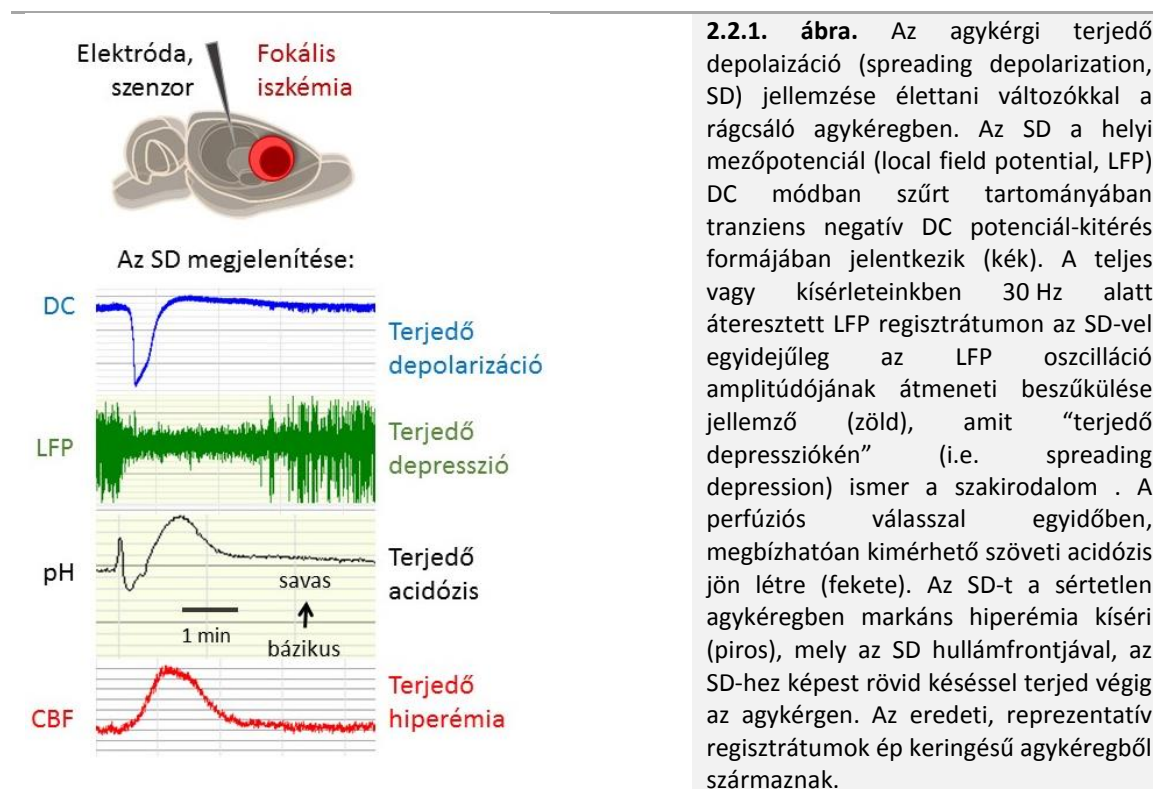
elmúlt tizenöt évben az SD kórélettani jelentősége a szaporodó klinikai eredmények függvényében egyre nagyobb figyelmet és hangsúlyt kapott.^{96,98,164} Az SD az agyi keringési válaszokat és az iszkémiás prekondicionálást vizsgáló kutatók eszköztárának egy eleméből fokozódó érdeklődésre számot tartó kórélettani jelenséggé nőtte ki magát.

A következőkben bemutatásra kerülő kísérletes munka középpontjában az SD, mint az akut agysérülésekben szerepet játszó kórélettani jelenség áll. Figyelmünk elsősorban arra irányult, hogy megállapítsuk, milyen körülmények kedveznek az SD kialakulásának, milyen térbeli jellegzetességekkel terjed az iszkémiának kített agykéregben, és milyen hemodinamikai és metabolikus változásokat von maga után a sérült agyban. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az SD-vel járó hemodinamikai változásokat mely vazóaktív mediátorok közvetítik. Végül kiemelt figyelmet szenteltünk annak, hogy az öregedés, mint az iszkémiás agysérülések nem befolyásolható kockázati faktora, miként módosítja az SD kialakulását, az SD-vel kapcsolatos szövetkárosodás mértékét. Kísérleteinkhez kialakítottunk egy egyedi, optikai elven működő, kísérletes képalkotó eljárást az SD és a társuló metabolikus és hemodinamikai változások térbeli jellegzetességeinek megfigyelésére. Eredményeink meggyőződésünk szerint transzlációs lehetőségeket hordoznak magukban, és a párhuzamosan futó klinikai tanulmányokkal összefonódva a klinikumban hasznosulhatnak.

2.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció ideglettani és farmakológiai jellemzői

Az SD az ideg- és gliasajtek egy kritikus tömegének (kb. 1 mm^3)^{249,378} együttes depolarizációja, mely egy pontszerű fókuszból kiindulva, lizenkefál agykéregben koncentrikusan, girenkefál agyban a barázdák mentén terjed tova.^{227,327,328} A terjedés sebessége jellemzően 2-8 mm/min, melyet eredetileg két, egymástól távol elhelyezkedő elvezetési pont segítségével határoztak meg.^{227,351} Az SD tipikus elektrofiziológiai jellemzője a DC potenciál tranziens, negatív kitérése, mely az agykérgi spontán elektromos aktivitás (ECoG) egyidejű, átmeneti depresszióval jár (i.e. „terjedő depresszió”)^{146,351} (2.2.1. ábra). A negatív DC potenciál-kitérés az idegsejtek potenciáljának a nyugalmi értékről a 0 mV-ot megközelítő eltolódását jelöli, ami mögött a káliumion extracelluláris koncentrációjának ($[K^+]_e$) drasztikus emelkedése (3-4 mM-ról 30-60 mM-ra), és ezzel együtt a nátrium- és a kalciumion extracelluláris koncentrációjának esése áll (Na^+ : 140-150 mM-ról 50-70 mM-ra; Ca^{2+} : 1-1,5 mM-ról 0,2-0,8 mM-ra).²⁹⁷

Az SD-t iszkémiás körülmények között valószínűleg a magas lokális $[K^+]_e$ idézi elő. Az iszkémiának kített sejtekből lassú, kifelé irányuló káliumáram figyelhető meg, melyet kísérletesen a DC potenciál lassú, negatív irányú csúszása is jelez.^{153,158} A K^+ felszaporodása az extracelluláris térben az ATP celluláris szintjének csökkenéséhez köthető, ami az ATP-függő K^+ -csatornák nyitásán keresztül egyrészt a K^+ kiáramlását eredményezi,³⁶³ másrészt a Na^+/K^+ pumpa aktivitását gátolva akadályozza a K^+ visszavételét is.¹⁵¹ Az SD kiváltásában a Na^+/K^+ pumpa nyilvánvaló szerepére világít rá az is, hogy a Na^+/K^+ pumpát bénító ouabain rámosása az idegszövetre SD-t vált ki.²¹ A felhalmozódó K^+ végül elegendően nagy koncentrációt elérve (10-12 mM) feszültségfüggő Na^+ -csatornákat nyit, a Na^+ beáramlására pedig bekövetkezik a sejtek depolarizációja, melyhez további kifelé irányuló káliumáram társul. Jellemzően a 10-15 mM-ra emelkedő $[K^+]_e$ teremt az SD kiváltásához kedvező feltételeket.³⁵⁵ Ezzel összhangban, magas koncentrációjú KCl oldat topikális rámosásával az SD sértetlen agykéregben kísérletesen is kiváltható.



Az SD kiváltását követően a depolarizáció, mint egy öngerjesztő jelenség, a $[K^+]_e$ és glutamátszint emelkedése révén, volumentranszmisszióval terjed tovább a szomszédos sejtcsoportokra, bár a neurotranszmitterek valószínűleg szinaptikus úton is ürülnek.^{146,351,397} Az ép kéregben átvonuló SD-vel a glutamát koncentrációja az extracelluláris térben 3-3,5 μM -ról 10-11 μM -ra emelkedik,¹⁷⁷ de anoxia alatt meghaladhatja a 100 μM -t is.³³⁰ A glutamát felszabadulását tekintve több útvonal részesedését is valószínűsítik. A glutamát felszabaduláshoz vezethet a neuronok P/Q típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatornáin beáramló Ca^{2+} ,^{17,297} a preszinaptikus NMDA-receptor függő vezikuláris excitáció,⁴²⁶ a glutamátra átjárható pannexin-1 csatornák megnyílása,^{43,87} és az asztrociták glutamát transzportereinek (excitatory amino acid transporter, EAAT) megfordulása az SD-re jellemző magas $[K^+]_e$ hatására.^{159,245,274} A nagy koncentrációban felhalmozódó glutamát valószínűleg szinaptikus és extraszinaptikus NMDA, valamint AMPA receptorok ingerlésével járul hozzá az SD terjedéséhez,^{67,160,339,407} melyet alátámaszt az SD gátlása az NMDA receptorokat antagonizáló ketaminnal.^{40,210,324} Meg kell azonban jegyezni, hogy míg ép keringésű vagy enyhe fokú iszkiémiának kitett szövetben az NMDA receptorok gátlása hatásosan akadályozza meg az SD létrejöttét, anoxia során az SD-t nem védi ki az NMDA receptorok blokkolása.^{173,297} Az SD terjedését támogató magas $[K^+]_e$ és glutamátszintet fokozhatja továbbá az extracelluláris tér csökkenése.^{156,295} Az SD-t jellemző ionáramokkal a víz is együtt mozog, ami a dendritek és az asztrociták duzzadását, így az extracelluláris tér beszűkülését okozza.³¹²

Az SD utáni repolarizációban döntő szerepet játszik a neuronális Na^+/K^+ pumpa, mely az extracelluláris térben felhalmozódott K^+ visszavételéért felelős.²⁴⁴ Központi jelentőségű továbbá az asztrociták részesedése az ionhomeosztázis helyreállításában. Az asztrociták K^+ felvételében részt vesz az asztrocitákon található Na^+/K^+ pumpa, a Kir 4.1 típusú befelé egyenirányító kálium csatorna, illetve az aquaporin-4 típusú vízcsatorna.²³⁰ A glutamát visszavétele az EAAT1 és EAAT2 típusú glutamát transzporterek révén valósul meg, melyek működése feszültség-függő, így hatékonyságukat nagymértékben befolyásolják az interstícium ionkoncentrációi.⁶² A glutamát felvételének 90 %-ért az EAAT2-t tartják felelősnek, továbbá az EAAT2 kifejeződése az asztrocitákra jellemző, így a glutamát visszavételében elsősorban az asztrociták szerepe hangsúlyozott.³¹⁰

Összefoglalva megállapítható, hogy az SD kialakulásának a $[K^+]_e$ emelkedése teremt kedvező környezetet. Maga az SD markáns ionáramokkal, az idegszöveti homeosztázis átmeneti felborulásával jár, és az SD terjedését az SD során nagy mennyiségben felszabaduló káliumion és glutamát közvetíti. Végül az SD utáni repolarizációban a neuronális K^+ visszavétel mellett az asztrociták K^+ és glutamát felvétele játszik fontos szerepet.

A fejezethez vonatkozó összefoglaló közlemény:

Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, **Farkas E**. Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarisation using a fluorescent, voltage-sensitive dye. *Neurochem Int.* 2018 Oct 15. pii: S0197-0186(18)30467-4.

2.2. Az agykérgi terjedő depolarizációval összefüggő metabolikus és hemodinamikai változások, a vérátáramlási válasz szabályozása

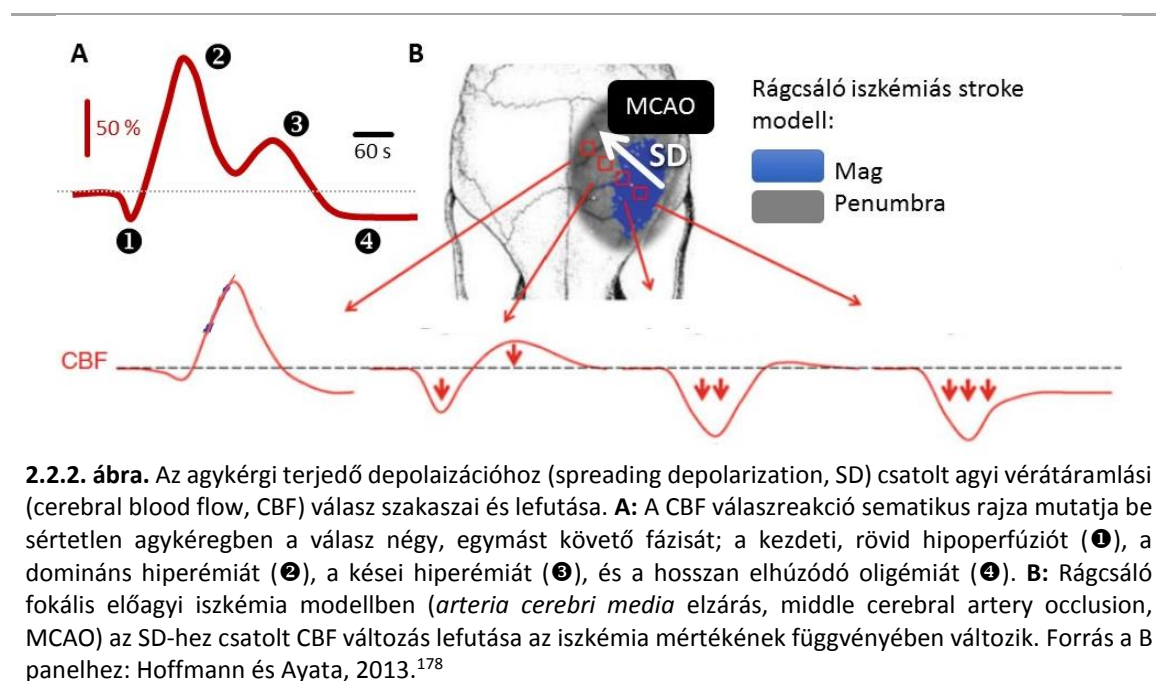
Az SD az egyre gyarapodó kísérleti eredmények szerint olyan metabolikus kihívást jelent az idegszövet számára, melyet az SD-hez csatolt, nagymértékű hiperémia sem tud maradéktalanul kielégíteni. A szöveti metabolizmust hűen tükrözi a szöveti pH SD-vel bekövetkező változása (**2.2.1. ábra**). Az extracelluláris pH válasz jellemzően három fázisú (a kezdeti, rövid acidózist rövid alkalózis, majd a pH választ meghatározó, jelentős acidózis követi), melynek domináns elemével a szöveti pH átmenetileg a fiziológiás 7,35-ről 6,95-re csökken.²⁶⁶ Az acidózis jól megfeleltethető a fokozott laktát-termelésnek.^{266,332} A laktátszint emelkedésével egyidőben a glükóz koncentrációja jelentősen csökken, és tartósan alacsony marad.^{71,132,260} Végül a glükóz-koncentráció változásának megfelelően az ATP mennyisége is közel felére esik vissza az SD-vel.²⁶⁰ A bemutatott, SD-re jellemző szöveti metabolikus változások a keringését tekintve ép agykérgben jól reprodukálhatóak, de iszkémia alatt jelentősen módosulhatnak. Ezt a problémakört tárgyalja alább az 5.4. fejezet.

Az SD támasztotta megnövekedett metabolikus igényt az SD-hez csatolt agyi keringési (cerebral blood flow, CBF) válaszreakció hivatott kielégíteni (**2.2.1. ábra**). A CBF válaszreakció alapvető tulajdonsága, hogy a hemodinamikai változás lokális, és az SD-vel együtt terjed tova az agykérgen. Az SD-vel járó CBF változásnak a legfrissebb elemzések szerint négy, egymást követő komponense különböztethető meg¹⁶ (**2.2.2. ábra, A panel**). Az első, rövid, hipoperfúziós szakaszt jelentős hiperémia követi, melynek mértéke az alapáramlást akár több, mint 200 %-al is meghaladhatja. A hiperémia ereszkedő fázisán egy második, kései áramlásemelkedés is megjelenhet. Végül a CBF a kiindulási alapérték alá süllyed, és egy hosszantartó, akár harminc percnel is tovább elhúzódó oligémia alakul ki.¹⁶ Ritka eset, hogy az SD-t követő áramlási válaszban mind a négy, felsorolt komponens jól kivehető. Az első, hipoperfúziós szakasz a $[K^+]_e$ függvénye, melyet a 6.3. fejezet részletez. A csúcs hiperémia mértékét az idegszövet metabolikus krízise befolyásolja, amit kutatásaink többszörösen igazoltak (5., 6.1. és 7.1. fejezet). Általánosságban elmondható, hogy az iszkémia súlyosbodásával a CBF válaszreakcióban előtrébe kerül a vazokonstrikció, a válasz kezdeti hipoperfúziós eleme teret nyer, és hiperémiás komponense ugyanakkor visszaszorul¹⁷⁸ (**2.2.2. ábra, B panel**). Ha a hiperémia helyét teljes mértékben átveszi a kezdeti hipoperfúzió, inverz csatolásról, illetve terjedő iszkémiáról beszélünk.^{96,101} A kései hiperémia kísérletes észlelését valószínűleg az altatószer megválasztása határozza meg; például patkányban lézer-Doppleres áramlásméréssel izoflurán altatásban nem, míg alfa-kloralóz altatásban jól kivehető.³⁶⁷ Végül a CBF változást záró oligémia jellemzően csak akkor rajzolódik ki, ha az SD kiváltásakor a szöveti perfúzió optimális, és nem korlátozott érelzáródás vagy egy korábbi SD oligémiás szakaszának fennállása miatt (4.1.2. és 4.2.1. fejezet).

A CBF válaszreakció lefutása fajonként is változó. A transzlációs kutatómunka szempontjából lényeges, hogy az egéragyban a hipoperfúzió jóval kifejezettebb, mint patkányban, míg az emberi agyban tapasztalható perfúziós változások jól megfeleltethetők a patkányban leírtaknak.²⁸⁵ Ezt

figyelmbe véve az SD-hez csatolt CBF változásokat szerencsésebb patkányban tanulmányozni, mint egérben.

Az SD-hez csatolt CBF változás szabályozása máig intenzív kutatások tárgyát képezi. A szabályozás megértését nehezíti, hogy a válasz többkomponensű, és az egyes elemek egymással átfednek. A szabályozás továbbá minden bizonnyal többszörösen összetett. Az SD terjedése során azonos helyen és egyidőben, nagy mennyiségben szabadulnak fel vazoaktív metabolitok (pl. adenozin, laktát), idegsejtekből kiáramló neurotranszmitterek (pl. glutamát), perivaszkuláris idegvégződésekől származó neuropeptidok (pl. kalcitonin relációs peptid, calcitonin-gene related peptide, CGRP), és a neurovaszkuláris csatolás asztricitákhoz kötött „klasszikus” mediátorai (pl. prosztanoidok, vagy epoxieikozatriénsavak).¹⁶ Abban a kérdésben sincs egyetértés, hogy az SD-vel járó hiperémia funkcionális, vagy inkább reaktív jellegű. A téma tehát sok kérdést vet fel, melyeket 6. fejezet tárgyal részletesen.



2.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció klinikai jelentősége

Az SD montirozása a klinikumban akut agysérülést követően a megfelelő módszer kidolgozásával vált lehetővé.³⁵⁹ Az SD-t a hajas fejbőrön elhelyezett elektródákkal nyert elektroencefalogramon (EEG) nem lehet azonosítani, mert a csont és egyéb lágy szövetek erősen árnyékolják a jelet, illetve a diagnosztikai EEG elektróda-konfiguráció, szűrési és erősítési beállításai, és mintavételezési frekvenciája nem optimális az SD megjelenítéséhez.^{109,166} Ez indokolta a szubdurális ECoG elektródasorok invazív felhelyezését célzottan olyan lézióközeli agykérgi felszínre, melyet CT felvételek segítségével határoztak meg.^{108,122,165} Az ECoG regisztrálás invazív jellege miatt az SD monitorozása a trauma vagy stroke súlyos következményei miatt (pl. intrakraniális hematóma) koponyaműtéten átesett betegekre korlátozódik.

A tanulmányokban részt vevő klinikai központokban (<http://www.cosbid.org/about-us/participating-centers>) ma már rutinszerűen alkalmazzák az ECoG monitorozást, de az adatgyűjtés nyilvánvalóan a poszt-operatív időszakra korlátozódik. Ahhoz, hogy adatokat nyerjünk a sérülés korábbi szakaszaiban bekövetkező elektrofiziológiai és hemodinamikai változásokról, megfelelő kísérletes modellekre van szükség, így a klinikai és kísérletes eredmények együttesen adhatnak átfogó képet az SD időbeli mintázatáról.

Az SD megjelenésének időbeliségére jellemző, hogy az akut, fokális inzultust (pl. iszkémia indukció, koponyatrauma) követően az első esemény percekben belül kialakul.^{184,271} A fokális iszkémia rágcsláló modelljében az ismétlődő SD események az iszkémia kiváltása utáni első két órára korlátozódtak, majd előfordulási gyakoriságuk 12 óra elteltével fokozódott ismét.¹⁶⁸ A barázdált macskaagyban az iszkémia kiváltását követően 14 órán át (a kísérletek végpontjáig) regisztráltak ismétlődő SD-eket.³²⁰ Végül idegsebészeti intenzív osztályokon monitorozott betegek agykérgében az elsődleges, akut sérülést ellátó műtéti beavatkozás után 9-14 napig azonosítottak SD eseményeket a több pontból elvezetett ECoG-on.^{108,122,165} A kísérletes és klinikai megfigyelések együttesen azt igazolják, hogy az akut agysérülés után az első SD percekben belül kialakul, és a sérülés szub-akut és krónikus fázisában még napokig ismétlődik.

Az SD-ről régóta feltételezik, hogy az iszkémiás sérüléseket súlyosbítja, kimenetelüket rontja.^{164,170} Az eredeti megfigyelések tanúsága szerint a fokális előagyi iszkémia rágcsláló modelljében az infarktus mérete arányosan nő a jelentkező SD-k számával, vagy kumulatív időtartamával.^{89,259} Betegekben a SAH szövődeményeként gyakran fellépő másodlagos iszkémiás károsodás (delayed cerebral ischemia, DCI) mértékét, illetve a TBI következményeként kialakuló kérgi lézió progrediálását hozták összefüggésbe az SD előfordulási gyakoriságával és időtartamával.^{108,167} Annak bizonyítására, hogy az SD hozzájárul az infarktus növekedéséhez – és nem a nagyobb kiterjedésű infarktusnak köszönhető adott esetben az SD gyakoribb előfordulása – fokális előagyi iszkémia modelljében az iszkémiás területtől távolabb SD-eket váltottak ki. A kísérletesen kiváltott SD-k ráterjedtek az iszkémiás penumbrára, és kimutathatóan növelték az infarktus méretét.^{35,370}

Az uralkodó elképzelés szerint az SD-vel összefüggésbe hozható neurodegeneráció hátterében az SD-hez csatolt CBF válaszreakció elégtelensége állhat,⁹⁶ amivel az 5.2. és 5.3. fejezet foglalkozik. A hipotézis központ eleme, hogy iszkémia alatt az SD utáni repolarizációhoz, az ATP-től függő ionpumpák (pl. a Na^+/K^+ pumpa) működéséhez szükséges megnövekedett oxigén- és glükózigényt a CBF változás nem tudja kielégíteni, mert a hiperémia mértéke alulmarad a szükségeshez képest, vagy éppen terjedő iszkémia társul az SD-hez.^{96,344} A terjedő iszkémiát először a fokális előagyi iszkémia egér modelljében, majd TBI betegekben hozták összefüggésbe a szöveti perfúzió fokozatos csökkenésével, és az agykérgi lézió méretének növekedésével.^{176,344} A klinikai tanulmányok arra következtetnek, hogy az SD szövetkárosító hatása akkor a legvalószínűbb, amikor az SD izoelektromos ECoG mellett alakul ki, az SD ismétlődő mintázatban, úgynevezett „cluster”-ekben jelentkezik, és az eseményekhez terjedő iszkémia társul.^{109,167,176}

Iszkémiás agyszövetben az SD a dendritek duzzadását, és dendrittüske-veszteséget von maga után, ami a szinaptikus kapcsolatok sérülését feltételezi.²⁶⁷ A legfrissebb vélemények szerint az idegszöveti elemek SD-vel összefüggő duzzadása okozza a citotoxikus ödémát az iszkémiás agyszövetben.¹⁰² Végül meggyőző eredmények utalnak arra, hogy az extracelluláris glutamát koncentráció emelkedése az SD-vel olyan mértékű, ami excitotoxicitáshoz vezet.^{164,177} Az excitotoxicitás alapja az idegsejtek túltelítődése Ca^{2+} -al, ami SD során a neuronális NMDA receptorokon túl feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül valósulhat meg.^{306,367}

Összefoglalva megállapítható, hogy az akut agysérülések szubakut fázisában az SD is felelős az infarktus méretének növekedéséért,^{164,170} a krónikus szakaszban pedig szintén összefüggésbe hozható a másodlagos károsodások több mechanizmusával, és így a szekunder léziók biomarkereként is szolgálhat.^{98,164,414}

2.4. Az életkor jelentősége az agykérgi terjedő depolarizációra nézve

Tekintettel arra, hogy az SD egyre több bizonyíték szerint közrejátszik az akut agysérüléseket követő másodlagos károsodások létrejöttében, fontos azonosítani azokat a körülményeket, amelyek kedveznek az SD kialakulásának. Az életkor nem befolyásolható rizikófaktora azoknak a neurológiai kórképeknek, amelyekben az SD-t kórélettani tényezőnek tekintik (pl. TBI, SAH, iszkémiás stroke). A TBI előfordulása például leggyakoribb gyermekkorban (esések), fiatal felnőtt korban (motorkerékpáros balesetek), és idős korban (esések).^{33,162} A SAH ugyanakkor a vérzéses stroke leggyakoribb formája fiatal felnőttekben, és a fiatal életkor a kései vazospazmus és a gyakori szövődeményként fellépő DCI rizikófaktora.^{47,70,85,241,301} Az iszkémiás stroke leginkább az idős korosztályt sújtja, hiszen előfordulási gyakorisága 50 év felett öt évente megduplázódik, és a sikeres felépülés esélye is egyre csekélyebb.^{51,235} Az idős agyban továbbá az iszkémiás penumbra gyorsabban válik a menthetetlen infarktus részévé.¹²

Annak ellenére, hogy az iszkémiás stroke gyakrabban fordul elő és súlyosabb kimenetelű az idősekben, a kísérletes kutatások zömében fiatal felnőtt rágcsálókra hagyatkoznak. A fiatal állatmodellek használatát valószínűleg gyakorlati megfontolások indokolják. A fiatal laboratóriumi patkányok vagy egerek beszerzése egyszerű és költséghatékony, a műtéti eljárásokat fiatal állaton könnyebben lehet kivitelezni, mint öregben, a kapott eredmények kevésbé szórnak, így kevesebb állat felhasználásával lehet statisztikailag meggyőző adatsorokhoz jutni. Azonban az elmúlt években sok kritika érte a kísérletes stroke modellek érvényességét. A fiatal rágcsálókban tett megfigyelések transzláthatósága korlátozottnak bizonyult, és a fiatal rágcsálókban hatékonynak talált neuroprotektív szerek rendre elbuktak a klinikai próbákon. Ezek a problémák részben az SD kutatást is érinthetik, hiszen az SD életkori jellemzőivel – különös tekintettel az öregkorra – gyakorlatilag senki nem foglalkozott az ilyen irányú munkánk megkezdése előtt. Az öregedés hatását az SD kialakulására és következményeire a 7.1. fejezet taglalja.

A fejezethez vonatkozó összefoglaló közlemények:

Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, Farkas E. Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarisation using a fluorescent, voltage-sensitive dye. Neurochem Int. 2018 Oct 15. pii: S0197-0186(18)30467-4.

Farkas E, Bari F. Spreading depolarization in the ischemic brain: does aging have an impact? J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014;69(11):1363-70.

2.5. Módszertani megközelítés

Az SD és a hozzá kapcsolódó agyi pathomechanizmusok tanulmányozására széles körben elterjedt az MCAO modell alkalmazása. Az érelzárást követően az SD spontán jelenik meg. A kérgi képpalkotás során azonban nehézséget jelent az MCA elzárása a hason fekvő, fejénél rögzített patkányban. A probléma kiküszöbölésére kísérleteink egy részében a fokális iszkémiát az MCA temporális koponyacsont alatti disztális szakaszának elzárásával idéztük elő (5.1. és 7.3.2. fejezet), illetve az *arteria carotis interná*ba infundált mikrogöngyök ($d < 20 \mu\text{m}$) segítségével multifokális iszkémiát indukáltunk (5.2. fejezet). Bár kísérleteink értékes eredményeket hoztak, nehézséget jelentett az, hogy a spontán jelentkező SD-k eredete, terjedési iránya, időbeli mintázata és elektrofiziológiai illetve hemodinamiai jellemzői nagy változatosságot mutattak. Másik korlátozó tényezőként merült fel, hogy nem-iszkémiás időkontrollt nem tudtunk az iszkémiás SD-k jellemzése mellé rendelni. A felvetődött problémák megoldására jó lehetőséget biztosított a munkacsoportunkban rutinszerűen alkalmazott globális előagyi iszkémia modell, melyet az *arteria carotis communis*ok kétoldali elszorításával („two-vessel occlusion”, 2VO) hozunk létre patkányban. A modell előnye, hogy a teljes agykérgen a fokális iszkémia penumbra régiójára jellemző áramlásviszonyokat hoz létre (i.e. 20-40 % között ingadozó CBF), ami az SD kórélettani szerepét tekintve a legnagyobb érdeklődésre számot tartó körülmény. A modell másik előnyös

adottsága, hogy spontán SD gyakorlatilag csak a 2VO létrehozásakor alakul ki, így a kísérletek további szakaszában, iszkémiás háttéren, kontrollált mintázatban válthatunk ki kísérletesen (magas koncentrációjú KCl oldat alkalmazásával) SD eseményeket. A permanens 2VO modellt a krónikus agyi hipoperfúzióval összefüggő neurodegeneráció és kognitív diszfunkció vizsgálatára alkalmazzák széles körben – és alkalmaztuk korábban mi is, hiszen a beavatkozás után a patkányok akár egy évig is utánkövethetők a Willis-kör szintjén megvalósuló keringési kompenzáció miatt. A 2VO után közvetlenül bekövetkező órák eseményei ugyanakkor hűen modellezik az agyi iszkémia akut fázisát.

Az SD fő ismérve az elektrofiziológiai regisztrátumokon jól felismerhető negatív DC potenciál-kitérés (**2.2.1. ábra**). Az SD terjedésére vonatkozóan hagyományosan több pontból történő elvezetéssel nyerhető megbízható információ. Ennek a módszernek az a hátránya, hogy az SD terjedésének irányát, illetve iszkémiás szövetben az infarktushoz viszonyított helyzetét nem lehet pontosan meghatározni. Az SD-vel foglalkozó kutatásaink kezdetekor ezért olyan képalkotó módszer kidolgozását tartottuk szükségesnek, amely az SD terjedéséről, különösen iszkémiának kitett agykéregben, megbízható információval szolgál.

Az idegszöveti potenciál-változások képi megjelenítésére ígéretesnek tűnt a feszültségfüggő festéken alapuló fluoreszcens képalkotás.^{148,149} Gerjesztő megvilágítás mellett, az idegszöveti sejthártyákhoz kötődött feszültségfüggő festék a fluoreszcencia-intenzitás membránpotenciál-változással arányos erősödésével jelzi az idegszöveti aktivitás fokozódását.^{148,149} Nagylátóterű képalkotás esetén az optikai jel intenzitásváltozása az elektrofiziológiával elvezetett mezőpotenciállal arányos. A feszültségfüggő festékek használatának előnye, hogy az idegszöveti aktivitás *in vivo*, valós idejű követését nagy térbeli (20-50 μm) és időbeli (milliszekundumos) felbontás mellett teszik lehetővé.⁴⁸ Ezt a módszert adaptáltuk az SD megjelenítésére patkány zárt koponyaablak preparátumban, hogy az SD terjedéséről az iszkémiának kitett agykéregben pontos képet kapjunk (**4.1. fejezet**).

A későbbiekben felmerült az igény a hemodinamikai változók egyidejű megjelenítésére, hiszen az agyi iszkémia modellezése során a CBF változásának követése lényeges az iszkémia mértékének és az egyes iszkémiás régiók kiterjedésének meghatározására. További, fontos szempont volt az SD-ket követő CBF változások (**2.2.2. ábra**) megjelenítése. Képalkotó módszerünket ezért kiegészítettük a CBF monitorozását szolgáló lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA). Az agyfelszínről visszaverődő fény intenzitása alapján (intrinsic optical signal, IOS) további modalitásokat építettünk képalkotó rendszerünkbe a szöveti térfogat és a hemoglobin szaturációjának követésére (**4.2. fejezet**). Végül annak a megválaszolására, hogy iszkémia során milyen szöveti pH viszonyok kedveznek az SD kialakulásának, vagy mutatnak egybeesést az SD terjedésével, az agykérgi pH változás képi megjelenítését is bevezettük a pH indikátor, fluoreszcens neutrálvörös festék (Neutral Red, NR) használatával (**4.3. fejezet**).

A fejezethez vonatkozó összefoglaló közlemény:

Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2007;54(1):162-80.

3. Célkitűzések

Az elmúlt tíz évben elvégzett kutatómunkát a következő, átfogó célkitűzések vezérelték:

- 3.1. Kísérletes, optikai elven alapuló képalkotó eljárások kidolgozása az SD és a társuló hemodinamikai és metabolikus változások térbeli megjelenítésére patkány agykéregben;
- 3.2. Az SD és a csatolt hemodinamikai és metabolikus változások és az iszkémia viszonyának feltárása, az SD-vel összefüggő sérülés mechanizmusainak azonosítása;
- 3.3. Az SD-hez csatolt vérátáramlási válaszok mediátorainak meghatározása;
- 3.4. Az öregedés hatásának megismerése az SD kóreltani jellemzőire.

4. Optikai elven alapuló, kísérletes, agyi képalkotási módszerek kidolgozása az agykérgi terjedő depolarizáció megjelenítésére

A kísérletes képalkotó eljárások figyelemreméltó fejlődése a 2000-es évek elején az SD kutatásban is teret nyert, és lehetővé vált az SD-vel járó helyi sejtduzzadás, illetve a keringési és metabolikus válaszreakciók térbeli mintázatának megfigyelése.

Régóta ismert, hogy SD során megváltoznak az idegszövet optikai tulajdonságai is, így a szövetről visszaferődő fény lokális intenzitásváltozása alapján (intrinsic optical signal, IOS) az SD megjeleníthető. Érhálózattól mentes szövetben, mint például az *in vitro* csirke retina preparátum, az IOS változását az SD-vel járó sejtduzzadás okozza.^{75,84} Az IOS értelmezése altatott kísérleti állat agykérgében azonban összetettebb, hiszen a térfogatváltozás illetve a hemoglobin szaturációjának megváltozása döntő mértékben járul hozzá a szövet fényelnyeléséhez, a szöveti szóródáshoz, ill. visszaverődéshez (az IOS hez). Zöld, 550 nm hullámhosszú megvilágítás mellett például az IOS intenzitása lényegében a szövet hemoglobin tartalmával, azaz a lokális vérmennyiséggel arányos.^{18,52-54,408}

Az SD-hez csatolt markáns CBF változás terjedésének követésére a lézer-folt interferencia kontraszt analízisen (LASCA) alapuló áramlási térképek számítása adott lehetőséget.³¹ A LASCA előnye, hogy egyetlen pont helyett a rágcsáló agykéreg egy néhány mm²-es felszínén is megjeleníthetőek a CBF változások.^{15,112} A LASCA vizsgálatok meggyőző, bár indirekt bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az SD hozzájárul az iszkémiás infarktus növekedéséhez. A CBF térképek tanúsága szerint az SD hullámfrontja mögött a CBF tartós csökkenése, így az iszkémiás infarktus fokozatos növekedése érhető tetten.^{112,357}

A mitokondriális red-ox állapot változása is megjeleníthető képalkotás segítségével. A légzési lánc elektron-transzportjában részt vesz a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) koenzim. A NAD⁺ redukált alakja, a NADH ultraibolya (UV) megvilágítás mellett kékben fluoreszkál, míg maga a NAD⁺ nem emittál. Ezek alapján a fluoreszcencia-intenzitás változásából a mitokondriális red-ox állapot változására lehet következtetni, bár a hemoglobin fényelnyelésére a jelet korrigálni kell.^{95,251,376} A módszert DC potenciál-elvezetéssel kombinálva kimutatták, hogy az SD-t a fluoreszcencia-intenzitás fokozódása, azaz a NAD⁺ redukciója kíséri.^{169,360}

Bár a bemutatott képalkotó technikák mind értékes adatokat szolgáltatottak, az eredmények értelmezésének korlátot szabott, hogy mind másodlagos, az SD-t követő élettani jelenségeket monitoroznak, nem magát a depolarizációt (a primer elektrofiziológiai eseményt). Ezért vállalkoztunk arra, hogy kutatásaink szolgálatába létrehozzunk egy olyan nagy látóterű optikai képalkotó eljárást, amely közvetlenül az SD-t, az idegsejtek depolarizációját teszi láthatóvá. A módszert a felsorolt képalkotó technikákkal (pl. IOS, LASCA) ötvözve válaszokat vártunk azokra a

kérdésekre, hogy fokális iszkémia során hol keletkeznek SD-k az iszkémiás maghoz képest, és azok miként járul hozzá az iszkémiás lézió növekedéséhez.

4.1. Az ideszöveti potenciálváltozások nyomon követése feszültség-függő festékkel

A SD-vel járó idegszöveti potenciálváltozások hagyományosan elektrofiziológiai módon, a DC potenciál elvezetésével mérhetők. A DC potenciál regisztrálása tű vagy üvegapillaris elektródával megbízható, kiváló időbeli felbontása révén az SD lefutását a szövet egy adott pontjában stabilan követi, de az SD térbeli terjedéséről kevés információt szolgáltat. Ezért célul tűztük ki egy olyan új képalkotó eljárás kidolgozását, amely egy feszültségfüggő festék fluoreszcenciája alapján az SD-re jellemző potenciálváltozásokat megfelelő időbeli és térbeli felbontással, képszerűen jeleníti meg. Az elképzelés megvalósításához egy olyan, a kereskedelmi forgalomban kapható, feszültségfüggő, fluoreszcens festéket választottunk (RH-1838; Optical Imaging Ltd., Rehovot, Izrael), amely az idegszövetben a sejthártyához kötődik, és fluoreszcenciájának intenzitása a transzmembrán-potenciál csökkenésével nő, lényegében a DC módban szűrt helyi mezőpotenciállal (local field potential, LFP) arányos jelet ad. További jelentős előnye, hogy időbeli felbontása milliszekundumos pontosságú, térbeli felbontásának pedig csak a jel-zaj viszony szab határt.¹⁴⁸ A kiválasztott festéknek továbbá a gerjesztési és emissziós hullámhossztartománya is kedvező (abszorpciós maximum: $\lambda=625$ nm, emissziós maximum: $\lambda=690$ nm), mivel azok optikai szűrővel egymástól biztonsággal elválaszthatók. A szükséges infrastrukturális háttér (pl. fényforrások, kamerák, eszközök működésének összehangolása) megteremtése után a módszert *in vitro* csirke retina preparátumon, és altatott patkány agykérgen állítottuk be és teszteltük. Az *in vitro* csirke retina preparátum előnye, hogy az SD a retinán kiválóan modellezhető, ugyanakkor a madárszem az emlősökben megtalálható érhártyától mentes, így az optikai képalkotásnak nem kell figyelembe vennie a vér fényelnyelését. Patkányban a zárt koponyaablak preparátum ezen túl megfelelően reprodukálja az agyszövetben kialakuló SD-t, a képalkotás későbbi felhasználását figyelembe véve a rágcsálóban az agyi iszkémia modellezése bevált módszer. A két modell, és a kapott eredmények az alábbiakban kerülnek részletes bemutatásra.

4.1.1. *In vitro* csirke retina preparátum

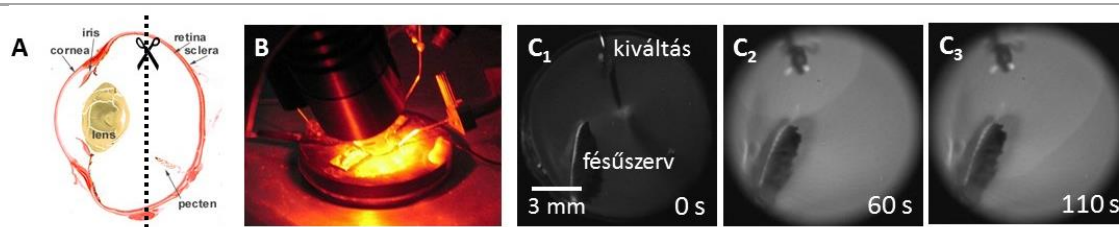
Módszerek

A retina preparátumhoz hím házi csirkék (Isabrown, 7-28 napos, $n=11$) bal szemét használtuk, melyet cervikális diszlokáció és dekapitáció után távolítottunk el. A szemet az egyenlítői síkban átmetszettük, az üvegtestet váladékszívóval eltávolítottuk, majd a hátsó féltekét szervkamrába helyeztük (**4.1.1. ábra**). A preparátumon Ringer oldatot áramoltattunk 1 ml/min áramlási sebességgel (az oldat összetétele: 100 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 30 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM glükóz; 95 % O₂ és 5 % CO₂ gázeleggyével buborékolatva). A szervkamra hőmérsékletét folyamatosan monitoroztuk, és 32 °C-on tartottuk. Az SD-k kiváltására a retina pereméhez közel egy mikrodialízis pumpával (CMA/100, CMA/Microdialysis, Solna, Svédország) összekötött acél kanült helyeztünk el, melyből 15 percenként 1 μ l 0,1 M KCl oldatot fecskendeztünk lokálisan a szövet felszínére.

A helyi mezőpotenciál elvezetésére (LFP) a retina belső szinaptikus rétegébe (stratum plexiforme internum) üvegapillaris elektródát szűrtünk (hegyének külső átmérője: 10 μ m). Referenciaként a szervkamra aljába illesztett Ag/AgCl elektróda szolgált. A jelet felerősítettük, DC módban szűrtük (nagy impedanciájú előerősítő: NL 834, további szűrők és erősítők: NL 125, NL 106; Neurolog System, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, U.K.), és folyamatosan rögzítettük egy

analóg-digitális (A/D) átalakítóval (DASH16, Metrabyte, Keithley Instruments Ltd., Reading, U.K.) társított számítógépen. Az elektromos jelet egy ASYST programban írt alkalmazás segítségével képernyőn jelenítettük meg (MacMillan Software Co., Keithley Instruments Ltd., U.K.), és később ugyanezzel a programmal analizáltuk.

A kiváltott SD-k áthaladása a preparátumon a retinasejtek ozmotikus duzzadása révén szabad szemmel is követhető. A visszavert fény törését és intenzitásváltozását kihasználva így az SD-k optikai jelét is rögzítettük. A retinát optikai szál segítségével, hideg, fehér fényel világítottuk meg (fény-nyaláb beesési szöge 45° a médium felszínéhez képest). A visszavert fényt (intrinsic optical signal, IOS) egy sztereomikroszkópra erősített ($3,2 \times$ nagyítás; MZ12.5, Leica Microsystems UK Ltd., Milton Keynes, U.K.) monokróm CCD kamerával rögzítettük (Qimaging, QICAM modell QIC-F-M-12; 12-bit digitális kimenet; Media Cybernetics UK, Marlow, U.K.). Számítógépes szoftver vezérlésével (ImagePro Plus; Media Cybernetics, U.K.), 2 Hz-es frekvenciával, 3 perc hosszú képsorokat vettünk fel 200 ms-os expozíciós idők mellett. A képsorok analízisét ugyanezzel a programmal végeztük. Minden esetben kijelöltünk a képsorokon egy érdeklődési területet (region of interest, ROI) (4.1.2. ábra) az SD terjedésével párhuzamosan, majd megadtuk a szűrkeszint intenzitásának ROI-ra eső átlagát az idő függvényében.



4.1.1. ábra. Az *in vitro* csirke retina preparátum. A szemet egyenlítői síkban metszettük el (A), majd a hátsó féltekét szervkamrába helyeztük. A szervkamrát fehér fényel, vagy a feszültségfüggő festék (RH-1838) gerjesztő hullámhosszán ($\lambda=625$ nm) piros LED fényforrással világítottuk meg (B). A kiváltott terjedő depolarizáció (SD) áthaladása a preparátumon a feszültségfüggő festékkel feltöltött szöveten jól követhető (C₁: RH-1838 inkubáció előtt; C₂-C₃: SD lefutásának megjelenítése RH-1838-al feltöltött szöveten). A C paneleken az SD-t kiváltó acél kanül a kép felső széléhez közel helyezkedik el; a képek bal alsó harmadában a madárszemre jellemző fésűszerv látszik.

Az SD-t jelölő mezőpotenciál-változások optikai megjelenítésére fluoreszcens, feszültségfüggő festéket használtunk (RH-1838, Optical Imaging Ltd., Rehovot, Izrael) (4.1.1. ábra). A festéket standard Ringer oldatban oldottuk; végső koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a $20 \times$ -osan hígított oldat optikai denzitása spektrofotométerrel mérve (Helios Gamma, Spectronic Analytical Instruments, Leeds, U.K.) 580 nm-es megvilágításnál 0,110 és 0,130 értékek közé essen. Az így elkészített RH-1838 oldatot -20°C -on tároltuk, és maximum 5 kísérlethez használtuk ismételten. A kísérletek megkezdésekor az RH-1838 oldatot a retina preparátumon 15 percig áramoltattuk 1 ml/perc sebességgel. Az első SD kiváltását megelőzően újabb 15 percig Ringer oldatos atmosférral távolítottuk el a festékfelesleget. Az egyes SD-k kiváltása során a szövetben felhalmozódott RH-1838-at piros LED fényforrással folyamatosan gerjesztettük (csúcs-hullámhossz: 625 nm; SLS-0307-A, számítógép-vezérelt tápegység: Sirius LED vezérlő SLC-SA04-U; Mightex, Pleasanton, CA, U.S.A.). A kibocsátott fluoreszcenciát egy sztereomikroszkópra erősített ($4 \times$ nagyítás; MZ12.5, Leica Microsystems UK Ltd., Milton Keynes, U.K.), felüláteresztő szűrővel ellátott (>670 nm; 695AF55, Omega Optical, Brattleboro, VT, U.S.A.), monokróm CCD kamerával rögzítettük (Pantera 1M30, Dalsa, Gröbenzell, Németország). Számítógépes szoftver vezérlésével (ImagePro Plus; Media Cybernetics, U.K.), 2 Hz-es frekvenciával, 3 perc hosszú képsorokat vettünk fel 500 ms-os expozíciós idők mellett. A fluoreszcencia-intenzitás SD-vel összefüggő időbeli

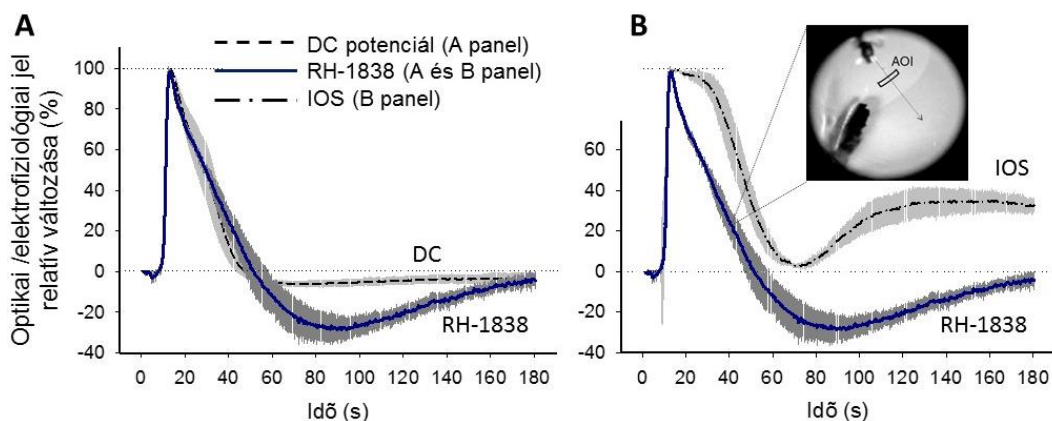
változásait az IOS analízishez hasonlóan értékeltük és ábráztuk, majd az RH-1838 a felvételi idő alatt lineárisnak mért fakulására korrigáltuk.

Annak érdekében, hogy a különböző elektromos és optikai jelek változásainak mértékét egymással összevethessük, a jeleket végül az alapra (0 %) és a maximum kitérésre (100 %) vonatkoztatott relatív formában is kifejeztük. Az egyes kísérletekből így kapott idősorokat végül a depolarizáció inflexió pontját figyelembe véve egymásra illesztettük, átlagoltuk, és átlag±stdev formában ábráztuk.

Eredmények, és azok értelmezése

Korábbi közleményekkel összhangban,^{77,247} a retinán terjedő SD-t a DC potenciál tranziens, negatív kitérése (amplitúdó: $-17,9 \pm 2,3$ mV, n=6) és az IOS tranziens emelkedése jellemezte (amplitúdó: $366,7 \pm 80,4$ szürkeszint változás, azaz a QICAM kamera 0-4095 terjedelmű szürkeskálája alapján 9,0 % emelkedés; n=6) (**4.1.2. ábra**). Az IOS SD-vel összefüggő változása annyira jelentősnek bizonyult, hogy az SD áthaladása a retina preparátumon szabad szemmel is láthatóvá vált. Az egyes kísérletekben ismételten kiváltott SD-k a DC potenciál és az IOS tekintetében egymáshoz nagyon hasonló kinetikát mutattak, így a jelenség kísérletesen jól reprodukálhatónak bizonyult. Az RH-1838-al feltöltött szöveten az SD-keket a feszültségfüggő festék fluoreszcencia-intenzitásának tranziens emelkedése kísérte (amplitúdó: $99,5 \pm 31,8$ szürkeszint változás, azaz a DALSA kamera 0-4095 terjedelmű szürkeskálája alapján 2,4 % emelkedés; n=5) (**4.1.1. ábra, C₂₋₃ panel**). Az egyes kísérletekben ismételten kiváltott SD-k RH-1838 alapú fluoreszcens jelintenzitás-változása is jól reprodukálható volt, kivéve a jel SD-vel összefüggő maximális kitérését, mely az egymást követő SD-k során fokozatosan csökkent. Ennek oka a fluoreszcens festék fakulásával magyarázható. Az adott kísérleti elrendezésben (azaz 625 nm hullámhosszcúcsú megvilágítás és 670 nm felett szűrt fénykibocsátás mellett) RH-1838 elhagyásával optikai jelet nem tudtunk rögzíteni. Ez a megfigyelés igazolta, hogy az RH-1838 alapú optikai jelet nem szennyezte egyéb, endogén eredetű fluoreszcencia.

Ahhoz, hogy az RH-1838 SD-vel kapcsolatos fluoreszcencia-intenzitásbeli változásait potenciálváltozásnak feleltethessük meg, a DC potenciállal hasonlóságot, az IOS-tól pedig eltérést vártunk. Megfigyeltük, hogy bár a depolarizáció fázisa a három szignál esetén tökéletes egyezést mutatott, a repolarizáció fázisa, illetve az alapvonalra történő visszatérés a három jelre nézve eltérően alakult (**4.1.2. ábra**). Az RH-1838-al megjelenített repolarizáció sebessége a DC potenciál visszatérésével egybeesett; ugyanakkor az RH-1838 fluoreszcenciája egy SD-t követő, jól látható hiperpolarizációt is jelölt. A hiperpolarizáció fázisa a DC potenciál illetve az IOS esetén nem mutatkozott. Az IOS kinetikája jelentősen eltért a DC potenciáltól és az RH-1838-alapú jeltől, mivel az IOS alapján a repolarizáció késleltetve alakult ki, illetve a felvett 3 perces időablakban nem állapodott meg az SD előtti alapvonalon (**4.1.2. ábra**).



4.1.2. ábra. A feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának intenzitásváltozása az idő függvényében, az *in vitro* csirke retina preparátumon átvonuló terjedő depolarizáció (SD) alatt. Az RH-1838 jelintenzitás-változását összevetettük a DC potenciál (A) és a visszavert fényintenzitás (intrinsic optical signal, IOS) változásival (B). Az egyes vonaldiagramokat számos SD átlagolásával kaptuk (RH-1838: n=5; DC potenciál: n=6; IOS: n=6), és átlag±stdev formában adtuk meg. A DC potenciál SD-t jelölő tranziens, negatív kitérését felfelé ábrázoltuk, hogy az optikai jelekkel egyirányba mutasson, és azokkal közvetlenül összehasonlítható legyen. A felvétel (B) hűen tükrözi az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitás-változását az SD-vel.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitásváltozása az SD DC módban elvezetett elektrofiziológiai jellemzőivel erős megegyezést mutatott, így az RH-1838 alapú optikai jel a szöveti potenciálváltozásoknak megfeleltethető. A hiperpolarizáció fázisára vonatkozó eltérés oka lehet, hogy az optikai jel és a DC potenciál keletkezése eltér; míg az elektróda pozíciójánál fogva a retina belső szinaptikus rétegéből regisztrált, az RH-1838 festéket feltehetően a retina minden sejt típusa és rétege felvette. Az is valószínűsíthető, hogy az RH-1838 gerjesztésére használt fény elsősorban a retina felszíni rétegeibe jutott be, így az emisszió döntően itt keletkezhetett.

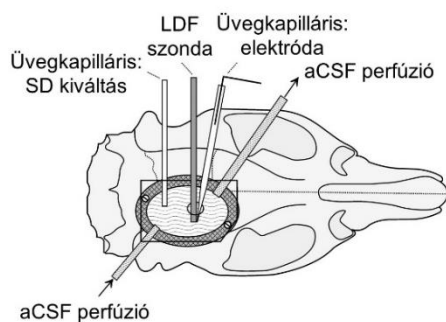
Összefoglalva, az RH-1838 feszültségfüggő festék *in vitro* körülmények között alkalmasnak bizonyult az SD-re jellemző mezőpotenciál-változások képi megjelenítésére. A kapott eredmények alapján a képalkotó módszert a továbbiakban altatott patkányon készített agykérgi preparátumra adaptáltuk.

4.1.2. Zárt koponyaablak altatott patkányon

Módszerek

Felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokat (260-380 g; Harlan UK Ltd., Bicester, U.K.; n=6) 1,5-2,0 % halotánnal altattunk N₂O:O₂ gázkeverék 2:1 arányú elegyében belélegeztetve. Az állatok a kísérletek során spontán lélegeztek. Testhőmérsékletüket rektális hőmérővel monitoroztuk, és visszacsatolásos elven szabályozott melegítőpárnával 37,1 és 37,4 °C között tartottuk (Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.). Az állatok fejét sztereotaxiás befogóba rögzítettük, majd fogorvosi fúró segítségével (Technobox 810, Bien-Air Dental S.A., Bienne, Svájc) a teljes jobb oldali parietális koponyaacsontot eltávolítottuk. A fúrófejet fiziológiás sóoldattal folyamatosan hűtöttük. A csontperemen zárt koponyaablakot alakítottunk ki (**4.1.3. ábra**): fogászati cementtel megmagasítottuk a csarnok oldalát, amely magában foglalt egy bevezető és egy kivezető polietilén csövet mesterséges cerebrospinális folyadék áramoltatására (artificial cerebrospinal fluid, aCSF). Beépítettünk továbbá a csarnok mediális falába egy mikrodialízis pumpával (CMA/100, CMA/Microdialysis, Solna, Svédország) összekötött, nyílásával közvetlenül az agykéreg fölé

pozícionált üveg kapillárist, amely a későbbiekben 1 μ l 1 M KCl kifecskendezése révén SD kiváltására szolgált. A koponyaablakot feltöltöttük aCSF-fel (az oldat összetétele: 126,6 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 24,5 mM NaHCO₃, 6,7 mM urea, 3,7 mM glükóz, 95 % O₂ és 5 % CO₂ gázelegyével buborékolatva), a kemény agyhártyát óvatosan eltávolítottuk, majd az ablakot mikroszkópos fedőlemezből méretre vágott (17 × 11 mm) üveg lemezzel zártuk le. A fedőlemezbe előzetesen egy 1 mm átmérőjű lyukat fúrtunk az SD kiváltási helyétől 2-3 mm-re anterior irányba, melyen keresztül az ablakba elektródát és lézer-Doppler szondát építettünk be.



4.1.3. ábra. Zárt koponyaablak kialakítása a patkány parietális agykérgé felett. Rövidítések: aCSF: mesterséges cerebrospinalis folyadék (artificial cerebrospinal fluid); LDF: lézer-Doppler áramlásmérő (Laser-Doppler flowmetry); SD: agykérgi terjedő depolarizáció (spreading depolarization).

Elektrofiziológiai regisztrátumok elvezetésére egy aCSF-fel feltöltött üveg kapilláris elektródát (hegyének külső átmérője: 20 μ m) vezettünk 22,5°-os szögben 1,2-1,4 mm mélyre az agykéregbe. Referenciaként a nyak bőre alá beültetett Ag/AgCl elektróda szolgált. Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) változásainak követésére az elektróda mellé lézer-Doppler szondát helyeztünk (Probe 411, PeriFlux 5000; Perimed UK Ltd., Bury St Edmunds, U.K.). A szondát a kérgi felszín közvetlen közelében úgy pozícionáltuk, hogy piális erekől mentes területet monitorozhasson. Az elektróda és a szonda bevezetésére szolgáló lyukat végül fogorvosi cementtel zártuk le úgy, hogy a látótérből minimális területet takarjon ki. A zárt koponyaablakban a fiziológiás koponyaúri nyomásnak megfelelő viszonyokat úgy reprodukáltuk, hogy a kivezető polietilén cső végét kb. 6 cm-rel az agyfelszín fölé emeltük. A koponyaablakban az aCSF-et folyamatosan, 25 μ l/min sebességgel, egy perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattuk (Gilson Minipuls 3, Anachem Ltd., Luton, U.K.). A lézer-Doppler jelet digitalizáltuk, és a DC potenciállal együtt, az *in vitro* csirke retina preparátumnál leírtakkal azonos módon erősítettük, szűrtük, tároltuk, és jelenítettük meg. A CBF változásokat relatív formában fejeztük ki a felvételek első 5 percét 100 %-nak, a szívmegállást követő jelet 0 %-nak tekintve.

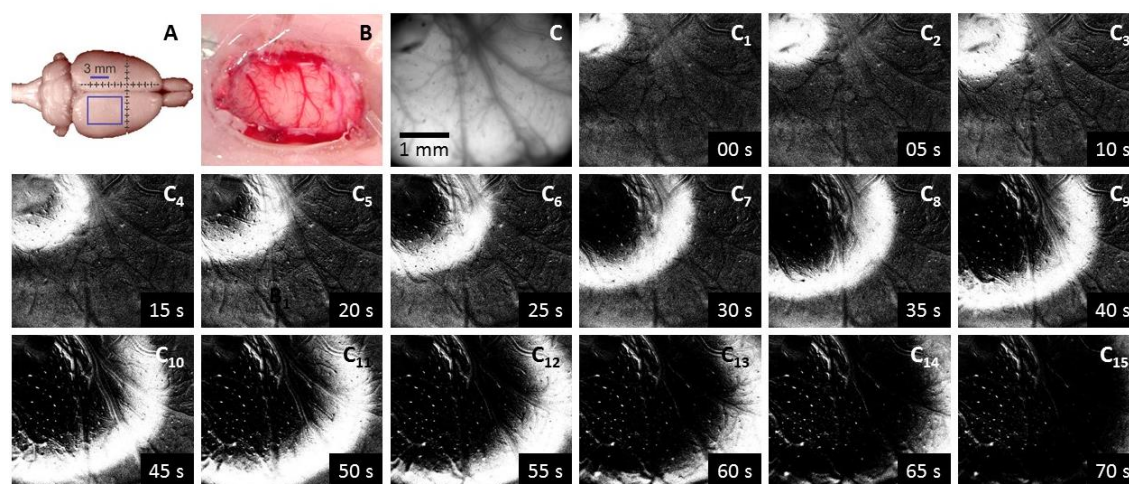
A mezőpotenciál változásainak optikai megjelenítéséhez az *in vitro* csirke retina preparátumnál bemutatott RH-1838 festékoldattal inkubáltuk az agykérget. Az RH-1838 oldatot a koponyaablakban 80 μ l/min áramoltatási sebességgel, 2 órán át keringettük, majd a fennmaradó festéket aCSF átáramoltatásával, 35 perc alatt mostuk ki. Az optikai képalkotás követte az *in vitro* csirke retina preparátumnál leírt módszereket, a következő módosításokkal. A digitális kamerát egy makro lencsével szereltük fel (2 × nagyítás, CCS SE-16SMS; Firstsight Vision, Tongham, U.K.), és a megvilágító LED fényforrást sávszűrővel egészítettük ki (620-640 nm; 3RD620-640, Omega Optical Inc., U.S.A.). Az expozíciós időt 100 ms-ra csökkentettük, és a festéket gerjesztő megvilágítást felvillanó módban, az expozíciós időre korlátoztuk. Végül a képsorok felvételének időtartamát 10 percre emeltük. Kísérletenként 4, egymást követő SD-t regisztráltunk, melyeket 15-21 percenként váltottunk ki.

A képsorok analízise az *in vitro* csirke retina preparátumnál leírtak szerint történt. A felvett SD események közül minden egyes kísérletből az első (SD1) és a második (SD2) eseményt elemeztük részletesen, mivel a csatolt vérátáramlási válaszok kinetikája a két egymást követő eseményre

nézve eltért, míg a harmadik és negyedik SD lefutása az SD2-vel megegyező volt.¹⁵ Mivel az RH-1838 az idő múlásával lineáris fakulást mutatott, a 10 perces képsorokból kapott intenzitás görbéket a fakulás meredekségének és a tengelymetszetének ismeretében korrigáltuk. A változások számszerűsítéséhez a következő jellemzőket mértük meg: a depolarizáció fél amplitúdónál mért időtartama, a depolarizáció és a repolarizáció kialakulásának sebessége, a hiperpolarizáció relatív amplitúdója, és az SD terjedési sebessége. A kapott eredményeket átlag \pm stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.); egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, melyet több csoport esetén Fisher post hoc teszt követett (szignifikancia küszöbe: $p < 0,05$).

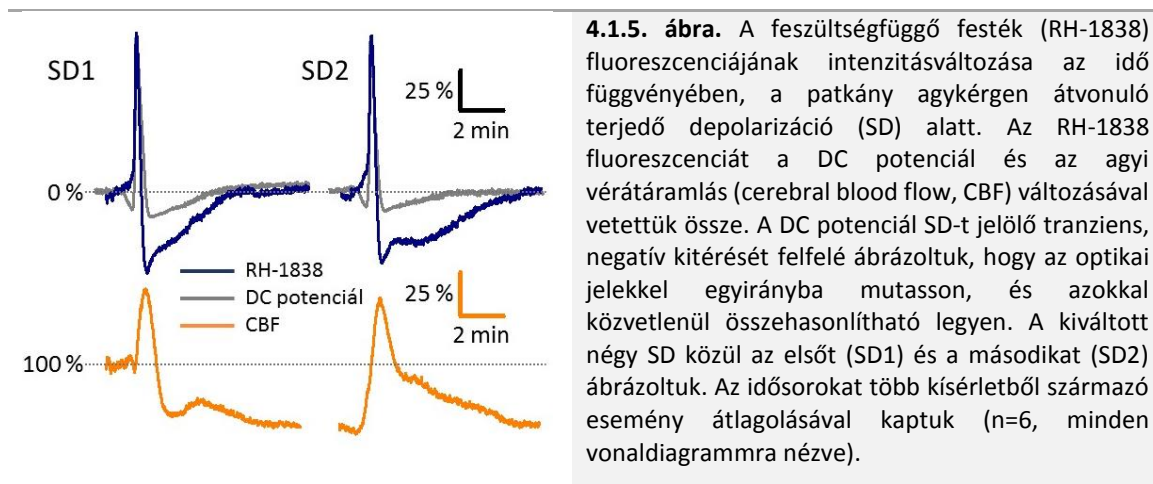
Eredmények, és azok értelmezése

A csirke retina preparátumon tapasztaltakhoz hasonlóan, az RH-1838-al feltöltött patkány agykérgen is az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának tranziens fokozódása jelezte az SD-ket (4.1.4. ábra). Az intenzitásemelkedés az SD-re korábbról ismert és jellemző sebességgel^{227,351} haladt át a látótéren (e.g. SD2: $3,28 \pm 0,31$ mm/min, $n=6$).



4.1.4. ábra. Terjedő depolarizáció (SD) áthaladása a látótéren a feszültségfüggő festékkel (RH-1838) feltöltött patkány agykérgen. **A:** A zárt koponyaablak elhelyezkedése a parietális kéreg felett. **B:** A koponyaablak területén feltárt kérgi felszín mutató reprezentatív fotó. **C:** Az agykérgi fluoreszcencia megjelenítése a képkalkoló rendszerrel RH-1838 inkubációt követően. Az SD kiváltására használt üveg kapilláris hegye a kép bal felső sarkában látszik. **C₁₋₁₅:** Reprezentatív képsor az SD optikai megjelenítésére feszültségfüggő festékkel. A képsort háttérkivonással és a kontraszt optimalizálásával kaptuk.

Az RH-1838 fluoreszcenciát a DC potenciálhoz hasonlítva megállapítható, hogy a depolarizáció és a repolarizáció fázisát megközelítőleg azonos módon jelezték (4.1.5. ábra). Bár az RH-1838 fluoreszcencia számszerűsítve lassabb depolarizációt és gyorsabb repolarizációt jelölt, az SD időtartama az RH-1838-ra és a DC potenciálra nézve azonos volt (4.1.1. táblázat). Ugyanakkor az SD-t követő hiperpolarizáció maximális relatív kitérése RH-1838 esetén jelentősen meghaladta a DC potenciál elvezetéssel regisztráltat (4.1.1. táblázat), és ennek függvényében a jel késleltetve tért vissza az SD-t megelőző alapértékre (4.1.5. ábra). Az RH-1838 fluoreszcencia és a DC potenciál között eltérés adódott az SD-t közvetlenül megelőző, rövid hiperpolarizáció megjelenítésében is. A DC potenciál megbízhatóan kirajzolta, míg az RH-1838 fluoreszcencia nem jelölte a depolarizációt megelőző, azzal ellenirányú rövid potenciálváltozást (4.1.5. ábra).

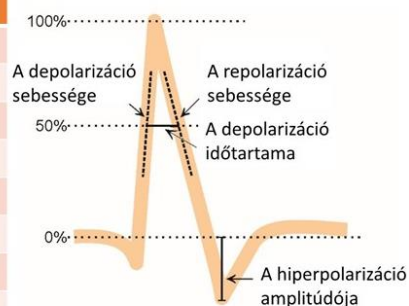


4.1.5. ábra. A feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának intenzitásváltozása az idő függvényében, a patkány agykérgen átvonuló terjedő depolarizáció (SD) alatt. Az RH-1838 fluoreszcenciát a DC potenciál és az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) változásával vetettük össze. A DC potenciál SD-t jelölő tranziens, negatív kitérését felfelé ábrázoltuk, hogy az optikai jelekkel egyirányba mutasson, és azokkal közvetlenül összehasonlítható legyen. A kiváltott négy SD közül az elsőt (SD1) és a másodikat (SD2) ábrázoltuk. Az idősorokat több kísérletből származó esemény átlagolásával kaptuk (n=6, minden vonaldiagramra nézve).

A vérben található hemoglobin nagyon erős fényelnyelő molekula. Annak megállapítására, hogy a hemoglobin fényelnyelése módosítja-e az RH-1838 fluoreszcenciát, az SD-t követő CBF változást is kiértékeltek (4.1.5. ábra). Megfigyeltük, hogy kísérleti modellünkben, korábbi beszámolókkal összhangban,²²⁵ az SD-ket markáns, tranziens hiperémia követte. A CBF változás görbéit úgy illesztettük a mezőpotenciál-változást jelölő diagramokhoz, hogy megmértük az RH-1838 intenzitásértékeihez használt ROI és az LDF szonda közötti távolságot ($1,32 \pm 0,31$ mm; n=6), valamint az SD-k terjedésének sebességét (SD1: $3,20 \pm 0,69$ mm/min, SD2: $3,28 \pm 0,31$ mm/min; n=6). Ezzel a megközelítéssel a hiperémia csúcsa egybeesett a hiperpolarizáció minimumpontjával (4.1.5. ábra). A számítások során apró pontatlanságot okozhatott, hogy nem tudtuk figyelembe venni az LDF szonda dőlési szögét (így a szövetet megvilágító lézernyaláb beesési szögét), és nem tudtuk megbecsülni azt a szöveti térfogatot, amelyből a CBF szignál ténylegesen keletkezett. Ezek figyelembevételével elképzelhető, hogy a hiperémia csúcsa a hiperpolarizáció minimumához képest kicsit késve jelentkezhetett.

4.1.1. táblázat. A patkány agykérgen kiváltott terjedő depolarizáció (SD) RH-1838 festékkel és DC potenciállal kapott kinetikájának számszerűsített jellemzése.

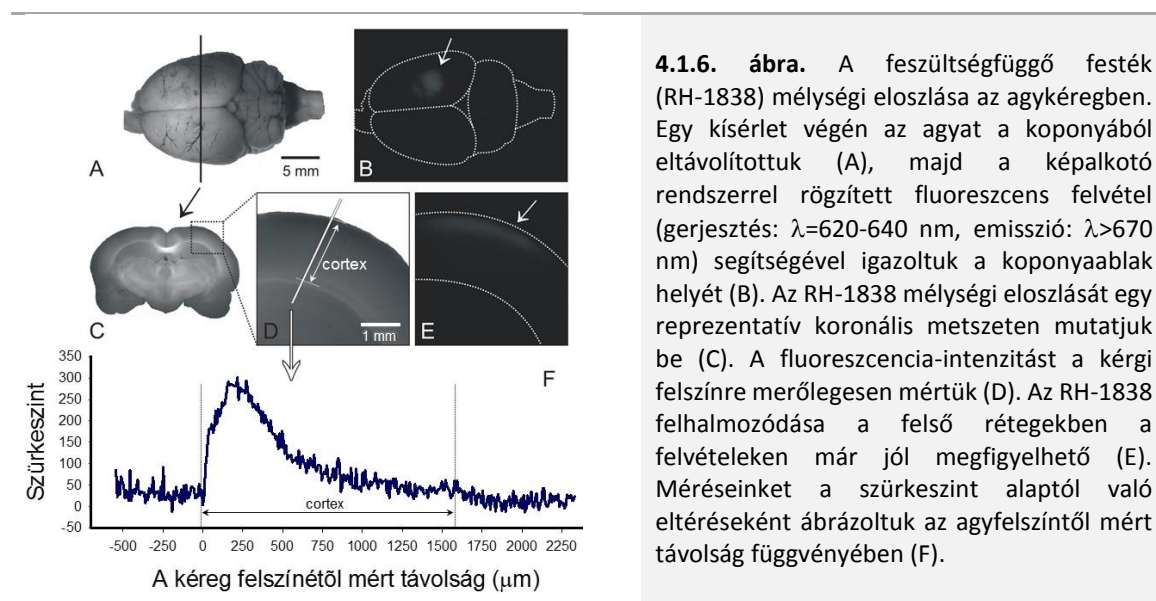
Vizsgált paraméter	SD nr.	DC potenciál	RH-1838
Időtartam (s)	SD1	18.8 ± 6.2	14.4 ± 1.6
	SD2	17.5 ± 6.1	16.5 ± 3.0
A depolarizáció sebessége (%/s)	SD1	38.2 ± 13.5	$20.5 \pm 6.6^*$
	SD2	28.6 ± 9.0	$18.4 \pm 3.4^*$
A repolarizáció sebessége (%/s)	SD1	-6.5 ± 2.1	$-9.2 \pm 1.9^*$
	SD2	-6.9 ± 2.1	-9.5 ± 2.6
A hiperpolarizáció amplitúdója (%)	SD1	-17.6 ± 6.1	$-55.6 \pm 13.3^{**}$
	SD2	-14.8 ± 7.8	$-50.4 \pm 18.3^{**}$



Az adatokat átlag \pm stdev formában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

Mérlegettük annak a lehetőségét is, hogy az RH-1838 fluoreszcenciája és a DC potenciál közötti eltérést okozhatja, hogy a kéreg nem ugyanazon rétegét monitoroztuk. Az üveg kapilláris elektróda hegyét a kéregbe 1,2-1,4 mm mélyre ültettük be, de arra vonatkozóan nem áll rendelkezésre adat, hogy a kérgi felszínre mosott RH-1838 a kéregbe milyen mélyen penetrál. Erre a célra az egyik állat agyából a kísérlet végén, 1 mm vastag koronális metszeteket készítettünk a koponyaablak magasságában, majd a képalkotó rendszerrel felvett fluoreszcens képeken meghatároztuk a fluoreszcencia-intenzitást a felszínre merőlegesen lefelé haladva, a kéreg teljes

mélységében (4.1.6. ábra). A vizsgálat megmutatta, hogy az RH-1838 a kéreg felső, 700 μm vastag rétegében halmozódott fel, legintenzívebben a felszín alatti 100-200 μm mélységű szövetréteget jelölte.



Eredményeink szerint az RH-1838 feszültségfüggő festék alkalmas az SD valós idejű, közvetlen képi megjelenítésére. Az SD-t tükröző RH-1838 szignál jól reprodukálható, ideális, magas jel-zaj viszony jellemzi, és megfelelő térbeli és időbeli felbontással rendelkezik. A legfontosabb tulajdonsága, hogy a DC potenciálváltozásokkal analógnak mutatkozott, ami alapján ez az új képpalkotó módszer - adott korlátok között - a DC potenciál elvezetésnek minden időpontban vett két dimenziójú megfelelőjének tekinthető.

Megfigyeléseink jelzik, hogy az RH-1838 fluoreszcenciát a mezőpotenciáltól független folyamatok is zavarhatják, viszont ezek súlya az SD monitorozása és a jelfeldolgozás során elfogadható határon belül maradt. A festék elhagyásával megismételt *in vitro* kísérleteink bizonyították, hogy endogén fluoreszcens források nem járultak hozzá, illetve nem módosították az RH-1838 fluoreszcenciáját. A patkány agykérgen végzett megfigyeléseink szerint a hemoglobin, mint fényelnyelő molekula, viszont befolyásolta a mért RH-1838 fluoreszcenciát, hiszen a fluoreszcens felvételeken a fényelnyelés révén a piális érhálózat sötéten rajzolódott ki (4.1.4. ábra, C panel). Ez a megállapítás azért lényeges, mert az SD-hez egy markáns, áramlásnövekedés társul, ezért a hemoglobin fényelnyelése az SD során a hiperémia kialakulásával jelentősen növekszik, csökkentve az RH-1838 fluoreszcencia intenzitását. Eredményeink szerint az SD-re válaszként kialakuló hiperémia csúcsa időben egybeesik az SD-t követő hiperpolarizáció fázisával (4.1.5. ábra), és az így megnövekedett fényelnyelés miatt jelöl az RH-1838 jóval kifejezettebb hiperpolarizációt illetve fokozatosabb visszatérést az alapvonalra, mint a DC potenciál. A hemoglobin csökkentheti az RH-1838 gerjesztését a megvilágító fény részleges abszorpciójával, de ugyanilyen elven az emissziót is tompíthatja. Végül számításba vettük, és felvételeinkkel igazoltuk az RH-1838 korábban már leírt, megvilágítástól függő fakulását.¹⁴⁹ Mivel a fakulás az adott időablakra (10 perc) nézve lineárisnak mutatkozott, a fluoreszcencia-intenzitás fokozatos csökkenésére matematikailag korrigáltuk a kapott görbéket.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

A kutatókat már régóta foglalkoztatta az SD megfigyelése képalkotó eljárások segítségével azért, hogy az SD kísérletes modellekben valós időben, két képi dimenzióban megjeleníthetővé váljon, és így terjedésének térbeli tulajdonságai tanulmányozhatóak legyenek. A korábban kidolgozott megközelítések viszont olyan változók rögzítésével értek el eredményt, amelyek az SD-hez társuló áramlási vagy metabolikus válaszokat monitorozták, az SD-t magát nem. Így például a CBF lokális változásainak lézer-folt interferencián alapuló képi megjelenítése jól láttatja az SD áthaladását a kérgi felszínen,^{112,225,358} hiszen az SD-t követő CBF változás térben ugyanúgy terjed, mint maga az SD.^{121,284,298} Hasonlóképpen, az SD-vel járó, és a CBF-el jól korreláló lokális vérvolumen-változást, illetve az oxigén-felhasználást jelölő hemoglobin-deszaturációt is meg lehet képalkotással figyelni.^{18,54,113} Végül a sejtek redox állapotát tükröző, a NADH autofluoreszcenciáján alapuló képalkotó módszert is kidolgoztak az SD követésére.^{253,372,381} Bár a felsorolt módszerek létjogosultsága és alkalmazhatósága vitathatatlan, az SD tekintetében mégis közvetettnek tekintendők, hiszen társuló (kór)élettani jelenségeket vizsgálnak. A hemodinamikai változók például az SD megőrzött kinetikája mellett is nagy variabilitást mutatnak a szövet metabolikus állapotának függvényében,¹⁶ ezért monitorozásuk nem ad az SD-re vonatkozó, megbízható információt. Az általunk kidolgozott, és itt bemutatott, feszültségfüggő festék fluoreszcenciáján alapuló képalkotás közvetlenül az extracelluláris eredetű DC potenciálnak feleltethető meg. Az SD-re jellemző, negatív, tranziens DC kitérést a festék fluoreszcencia-intenzitásának időben azonos lefutású növekedése jelöli.

A feszültségfüggő festéket eddig a látókéreg, hallókéreg és a szomatoszenzoros kéreg funkcionális szerveződésének feltérképezésére használták.^{55,130,148,276} Szintén sikeresen alkalmazták epilepsziás görcsaktivitás fókusznak azonosítására,^{240,304} és gátló GABA aktivitás keletkezésének és terjedésének követésére.^{49,86} Eredményeink alapján ez az optikai képalkotó eljárás ígéretes az agykérgi iszkémiás sérülések patogenezisének tanulmányozására, és különösen az infarktus időbeli és térbeli növekedésének követésére a stroke különböző állatmodelljeiben.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Farkas E, Pratt R, Sengpiel F, Obrenovitch TP. Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarisation using a fluorescent, voltage-sensitive dye. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(2):251-62.

4.2. A hemodinamikai változók szinkron rögzítése

A mezőpotenciál-változásokat monitorozó képalkotó módszer kialakítását követően felmerült az igény a CBF egyidejű megjelenítésére, hiszen az agyi iszkémia modellezése során a CBF változásának követése lényeges az iszkémia mértékének és az egyes iszkémiás régiók kiterjedésének meghatározására. További, fontos szempont volt az SD-ket követő CBF változás megjelenítése.

Az agykéregben a CBF valós idejű követésére elterjedt módszer a lézer-Doppleres áramlásmérés. Ennek alapja a Doppler effektus, azaz a mikroérhálózatot megvilágító lézernyaláb visszaverődésekor keletkező frekvencia-eltolódás, amely arányos a közeledő vagy távolodó vörösvértestek sebességével. A módszer megbízható, kiváló időbeli felbontással rendelkezik, de a perfúzió térbeli eloszlásának jellemzésére nem alkalmas. A térbeli felbontás érdekében a lézer-Doppler elven működő áramlásmérőt továbbfejlesztették, így pásztázó üzemmódban az agyfelszínről két dimenziós áramlási térképeket is létre lehet hozni.²²⁵ A pásztázás viszont időigényes, ami a módszer időbeli felbontását behatárolja.³²

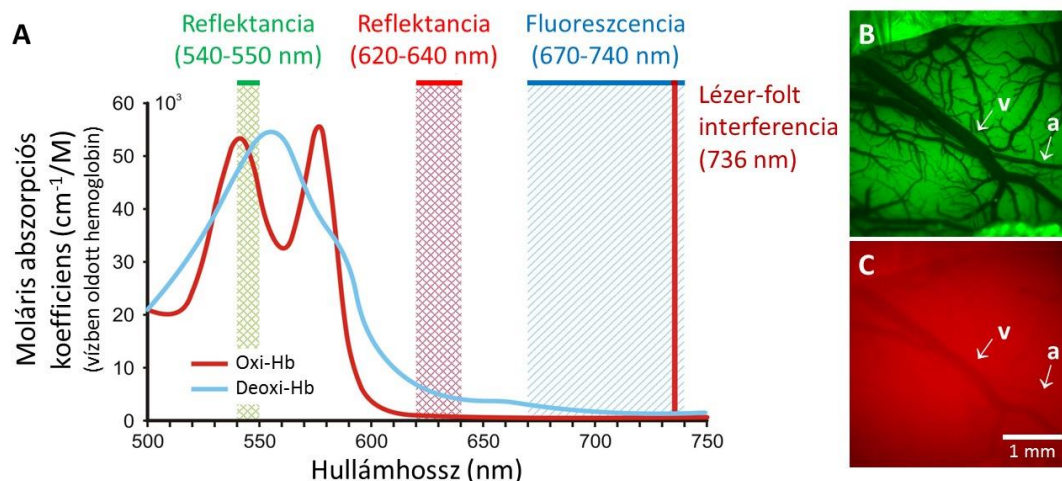
A LASCA-n alapuló áramlásmérést eredetileg különböző szövetek – köztük a bőr és a retina – perfúziómegoszlásának vizsgálatára használták sikerrel,^{31,319,375} majd később az agykérgi felszín

áramlásviszonyainak képi megjelenítésére is kiválóan alkalmasnak bizonyult.¹¹² A képalkotás alapját a lézernyalábbal megvilágított agy felszínéről kapott szórási interferencia képek adják, melyeken a vérátáramlás növekedését a kontraszt csökkenése jellemzi. A LASCA-t a lézer-Doppleres áramlásméréssel összevetve bebizonyosodott, hogy a két módszerrel nyert eredmények jól megfeleltethetők egymásnak. Altatott rágcsálókban a bajuszingerlésre vagy CO₂ belélegeztetésre kialakuló lokális illetve globális áramlásnövekedés, és az *arteria cerebri media* (MCA) elszorításával okozott áramlásesés mértéke LASCA-val mérve jól megközelítette a lézer-Doppleres áramlásmérés eredményeit.¹⁵ A megfigyelésekből azt a következtetést vonták le, hogy a LASCA megbízható és jól alkalmazható mérési eljárás, azzal az egyértelmű előnnyel a lézer-Doppleres módszerhez képest, hogy kiváló időbeli felbontása mellett térbeli felbontást is biztosít.¹⁵

A kereskedelmi forgalomban lévő LASCA rendszerek (pl. PeriCam PSI System, Perimed AB, Jarfalla, Sweden) a beépített szoftveres háttérrel nagyon hatékonyan működnek, felhasználóbarátok, és mára a kísérletes laboratóriumokban elterjedtek. Hátrányuk, hogy más optikai modalitásokkal nem, vagy nehezen integrálhatók. Ahhoz, hogy a mezőpotenciál- és szöveti perfúzió-változásokat együttesen meg tudjuk jeleníteni, egy a saját kutatási céljainkat szolgáló, feszültségfüggő festék fluoreszcenciáján és LASCA-n alapuló duális képalkotó rendszert terveztünk meg és állítottunk össze.

A későbbiekben ezt a két modalitást kibővítettük, kihasználva a hemoglobin fényelnyelő tulajdonságait. A bővítés két, jól megforgalmazható célt szolgált: a hemodinamikai változások szélesebb körű jellemzését és megértését, valamint potenciális optikai melléktermékek kiszűrését. Az agyi térfogat (cerebral blood volume, CBV) helyi változásainak nyomon követéséhez 540-550 nm hullámhosszú zöld fényelnyelővel világítottuk meg az agyfelszínt.^{114,137,398} Ez a hullámhossztartomány a hemoglobinra jellemző izobesztikus pont, azaz az oxigénnel szaturált és deszaturált forma fényabszorpciója megegyezik (**4.2.1. ábra, A panel**). Az elnyelt és a visszavert zöld fény intenzitása tehát arányos a vizsgált szövet teljes hemoglobintartalmával, azaz a vérmennyiséggel. Mivel a hemoglobin fényelnyelése ezen a hullámhosszon jelentős (**4.2.1. ábra, A panel**), a kapott képeken az agyfelszíni érálózat erős kontraszttal rajzolódik ki (**4.2.1. ábra, B panel**). A kamerával felvett képek a visszaverődő fény intenzitását tükrözik, így a magasabb intenzitásértékek, a kisebb fényelnyeléssel arányban, a CBV csökkenésére engednek következtetni.

A feszültségfüggő festék (RH-1838) 620-640 nm-es, piros gerjesztési hullámhossztartományát a szaturált és a deszaturált hemoglobin nem egyformán nyeli el. A deoxigenált forma fényabszorpciója magasabb az oxigenált hemoglobinénál (**4.2.1. ábra, A panel**). Ez az eltérés lehetővé teszi, hogy a megvilágított agykéregről visszaverődő piros fény intenzitásából a hemoglobin oxigenáltságára következtessünk, azaz a visszaverődő fény intenzitásának csökkenését a hemoglobin deszaturációjának feleltessük meg. Az így kapott képek magas intenzitásúak, de gyengén kontrasztosak a 620-640 nm hullámhossz-tartományú fény gyenge elnyelése miatt (**4.2.1. ábra, A panel**), és a vénák a deoxigenált hemoglobin magasabb abszorpció tulajdonsága révén határozottabban látszanak, mint az arteriolák (**4.2.1. ábra, C panel**). Mivel a feszültségfüggő festék használata révén ez a fényforrás a képalkotó rendszerbe beépítve eleve adott volt, kisebb adaptációval a gerjesztésre és a fényvisszaverődés alapú vizsgálatokra is alkalmazni tudtuk. Mindezeket figyelembe véve és kihasználva, a zöld és piros fény alapú reflektancia integrálásával a feszültségfüggő festék fluoreszcenciája és a LASCA mellé, célunk volt egy multi-modális, valós idejű, optikai elven működő képalkotó rendszer létrehozása.



4.2.1. ábra. A hemoglobin oxigenált (Oxi-Hb) és deoxigenált (Deoxy-Hb) formájának fényelnyelési spektruma, és a felvett képekre vonatkozó, sávszűréssel meghatározott hullámhossz-tartományok (A). A visszavert fény intenzitását (intrinsic optical signal, IOS) megjelenítő reprezentatív képeket a zöld (540-550 nm) (B) és a piros (620-640 nm) (C) tartományban, azonos látótéren vettük fel a patkány jobb oldali parietális kérgi felszínéről. A képek felső széle a medialis, jobb széle a *rostralis* iránynak felel meg. Rövidítések: a: arteriola, v: vena.

4.2.1. Az agyi vérátáramlás képi megjelenítése lézer-folt interferencia kontraszt analízissel: duális képalkotás

Módszerek

A módszertani fejlesztést az előző fejezetben (4.1. fejezet) részleteiben bemutatott, feszültségfüggő festékkel (RH-1838) feltöltött, patkány zárt koponyaablak preparátumot alkalmazva végeztük ($n=6$). A bal oldali vena femoralisba polietilén kanült ültettünk be. A kísérleti protokoll is egyező volt: 10 perc alapszakasz felvételét követően 20 percenként egymás után négy SD-t váltottunk ki. A kísérleteket 1 ml levegő embólus vénás beinjektálásával (*vena femoralis* kanülon keresztül), a szív megállításával fejeztük be.

Az RH-1838 képalkotás is hasonló volt az előzőekben bemutatottakhoz (4.1. fejezet), a következő módosításokkal: a kamerán az RH-1838 emisszió rögzítéséhez a felüláteresztő szűrő helyett sávszűrőt használtunk (3RD 670-740; Omega Optical Inc). A mintavételezési frekvenciát 2 Hz-ről 1 Hz-re csökkentettük az RH-1838 fakulásának lassítása, így a felvételi idő növelése érdekében. Az alacsonyabb mintavételezési frekvencia, az SD lassú lezajlása miatt, nem akadályozta az SD pontos időbeli követését. Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának erősítésére a kamera szenzorán 2×2 pixelt egybeolvastattunk („binning”), így a kamera maximális 1024×1024 pixel felbontása helyett 512×512 pixel felbontású képekkel dolgoztunk. A $3,8 \times 3,8$ mm méretű látótérről készült képek nagyítása $3,15 \times$ -es volt.

Ugyanazon agykérgi felszínről a LASCA áramlási térképeket lézeres megvilágítással nyertük (lézer dióda: Sanyo DL7140-201S; 70 mW; 785 nm). A lézer diódát a tápegység (ITC502, Thorlabs Ltd., Cambridge, U.K.) 100 mA áramerősséggel üzemeltette. A nyers interferenciaképeket egy második CCD kamerával vettük fel, mely műszaki paramétereit tekintve teljesen megegyezett az RH-1838 fluoreszcenciáját rögzítő kamerával. A két kamerát 1:1 binokuláris fénynyaláb elosztóval erősítettük a sztereomikroszkópra. Mindkét kamerát egy-egy erre a célra konfigurált, Camera Link kártyával felszerelt (Phoenix, PHX-D24CL; Active Silicon Ltd., Uxbridge, U.K.) számítógéphez csatlakoztattuk, és a számítógépeken futó ImagePro-Plus szoftveren keresztül vezéreltük (Media Cybernetics UK, Marlow, U.K.). A fényforrások és a két kamera együttes működését egy harmadik

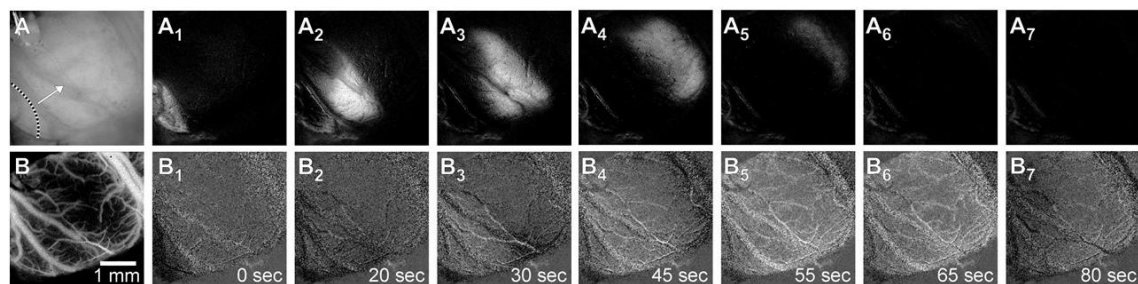
számítógép időzítette (Metrabyte DAS-20, ASYST Macmillan szoftver; Keithley Instruments Inc., Reading, U.K.) úgy, hogy minden egyes másodpercben a piros LED 100 ms-ig villant fel az első kamera expozíciójával együtt, majd 20 ms-ig a lézer dióda világított a második kamera expozíciójával szinkronban. Megközelítőleg 110 perces, 6600 db képből álló képsorokat vettünk fel 1 Hz-es frekvenciával. A felvett, nyers interferenciaképekből LASCA révén MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, U.S.A.) vagy ImagePro-Plus szoftver környezetben áramlási térképeket nyertünk.^{56,57} A CBF áramlási térképek eredeti 1024×1024 pixeles felbontását az RH-1838 képekével megegyező 512×512 pixelesre csökkentettük az összehasonlíthatóság érdekében.

A képsorokból intenzitásértékeket tetszőlegesen, manuálisan felhelyezett ROI-k (méret: 3×3 pixel) segítségével mértünk. A választott ROI pozíciója minden egymást követő képen és a két modalitásban (RH-1838 és CBF) azonos volt. A ROI-k helyét úgy választottuk meg, hogy a képeken kirajzolódó erekől mentes területre essenek. A ROI-kból kiolvasott intenzitásértékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Az adatok számítása, ábrázolása és értékelése megegyezett az előző fejezetben (4.1. fejezet), a patkány zárt koponyaablak esetén bemutatottakkal.

Eredmények, és azok értelmezése

Bár az RH-1838 képalkotás paraméterein az eredeti módszerekhez képest változtattunk, a módosításokkal is ugyanolyan jó minőségű képsorokat kaptunk (4.2.2. ábra, A panelsor). Az SD-ket az elvártan megfelelően az RH-1838 fluoreszcenciájának tranziens, tovaterjedő intenzitás-fokozódása jelezte. Az intenzitás emelkedésének maximális kitérése a kamera szűrkeszint skáláján, SD1 esetén $142,9 \pm 34,0$ gl értékű volt, amely az SD-t megelőző alapérték $8,10 \pm 1,8$ %-ának, a kamera 12-bites (0-4095) szűrkeszint skáláján 3,5 %-os növekedésnek felelt meg.

Az RH-1838 képsorokkal időben szinkron képzett, monokróm CBF térképek jól szemléltették az áramlásnövekedést, amelyet a szürke világosabb árnyalatai jelöltek. Az SD RH-1838-al megjelenített hullámfrontjához képest a hiperémia kis késéssel alakult ki és csengett le, és diffúzabb formában jelent meg (4.2.2. ábra, B panelsor). A LASCA áramlási térképek térbeli felbontása és jel-zaj aránya kielégítőnek bizonyult, és megfelelt a módszer korábban közölt jellemzőinek.^{15,408}



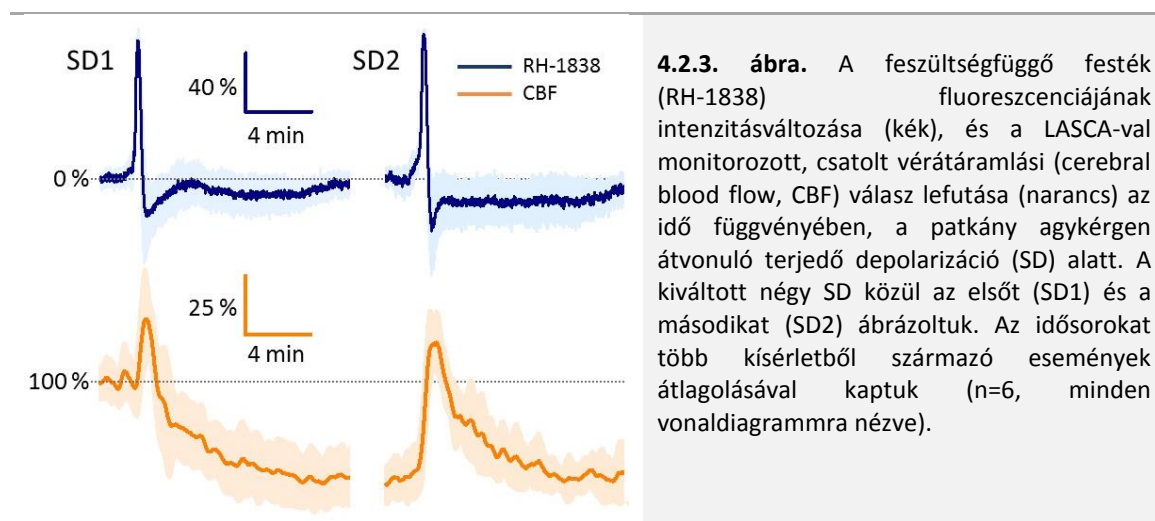
4.2.2. ábra. A terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD) járó mezőpotenciál-változások és a csatolt vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz egyidejű képi megjelenítése feszültségfüggő, fluoreszcens festék (RH-1838) (A) és lézer-folt interferencia kontraszt analízis (laser-speckle contrast analysis, LASCA) (B) segítségével. A natív, anatómiai viszonyokat bemutató képeket (A és B) követő reprezentatív sorozatokat (A₁₋₇ és B₁₋₇) háttérkivonással kontrasztosítottuk. Az A panel bal alsó sarkában látható szaggatott vonal és nyíl az SD hullámfrontját, és a terjedés irányát jelzi.

Az SD és a hozzá kapcsolódó CBF válaszreakció időbeli kapcsolatát több korábbi tanulmány vizsgálta kísérleti körülmények között rágszáló agykéregben fiziológias, illetve iszkémiás körülmények között. A legkorábbi kutatások során az SD-t K^+ -szenzitív mikroelektrodával regisztrálták, a válaszul kialakuló CBF változásra [^{14}C]butanol vagy [^{14}C]jód-antipirin *i.v.* bólus

infúziója után, az *in situ* gyorsfagyasztott agyból készült metszetek felhasználásával, autoradiográfiai módszerrel következtettek.¹⁵⁶ A későbbiekben lézer-Doppleres áramlásméréssel határozták meg az SD-t követő CBF változást, DC elvezetéshez vagy szöveti kálumszint-méréshez társítva.^{142,284} Végül a CBF megjelenítésére kidolgozott LASCA módszert is alkalmazták SD modellekben önmagában,^{15,358} más optikai jelek regisztrálásával kombinálva,^{113,408} vagy intrakortikális elektróda használata mellett.³⁴⁴ A felsorolt megközelítések egyike sem alkalmas arra, hogy a szöveti depolarizációt és az ehhez tartozó CBF válaszreakciót akár több, tetszőleges kérgi pozícióban és időpontban, térben és időben teljesen szinkron monitorozza. Az itt bemutatott, laborunkban kidolgozott módszer lényeges előrelépés az SD és a hozzá társuló CBF változás pontos térbeliségének és időbeliségének meghatározására, mivel az RH-1838 és CBF képpárok a látótér bármely területén és bármely időpontban, megfelelő időbeli és két dimenziós térbeli felbontással mutatják be a csatolás jellegét.

Lényeges előnyt jelent a beültetett elektródákkal, rögzített CBF szenzorokkal szemben, hogy a képsorokon utólag jelölhető ki tetszőleges ROI a látótér kiválasztott területein. Amellett, hogy így a látótérben kirajzolódó erek elkerülésével jó megközelítéssel a parenchyma áramlásviszonyait monitorozhatjuk, ez a tulajdonság különös jelentőséggel bír iszkémia vagy TBI állatmodelljeinek esetén. A felvételeken megadott ROI-k lehetővé teszik az SD-CBF kapcsolat összehasonlítását eltérően perfundált szöveti zónákon, illetve különösen előnyösek akkor, amikor a spontán kialakuló SD-k kiindulási pontja és terjedési tulajdonságai (pl. a terjedés iránya, sebessége, a hullámfront egyenetlenségei) előre nem jósolhatók meg. Későbbi munkánk során hatékonyan használtuk ki ezt a módszertani adottságot a patkányban modellezett globális és (multi)fokális agyi iszkémia során létrejövő SD-k tanulmányozására (5. fejezet).

A ROI területéről kiolvasott intenzitásváltozásokat az idő függvényében ábrázoltuk (4.2.3. ábra), és azt állapítottuk meg, hogy a LASCA-val kapott, SD-hez csatolt CBF változások lényegében megfeleltethetőek a korábban ugyanebben a modellben, lézer-Doppleres eljárással mérhetőknél (4.1.5. ábra). SD1 estén szembevetendő az SD-vel szinkron kialakuló hiperémia, majd az azt követő, hosszan elhúzódó oligémia. Az ismételten kiváltott SD-khez (pl. SD2) társuló CBF változás a várakozásoknak megfelelően az SD1 utáni oligémiáról indult, és a hiperémia után oda is tért vissza (4.2.3. ábra). Más modellekben gyakori, hogy az SD1-hez csatolt áramlási válasz első, hiperémiát megelőző fázisa egy rövid ideig tartó, kismértékű hipoperfúzió.¹⁶ A CBF válaszreakciónak ezt a korai komponensét a kísérleteink során kialakított zárt koponyaablak preparátumban sem lézer-Doppleres, sem LASCA-alapú áramlásméréssel nem tapasztaltuk.



Az RH-1838 és LASCA alapú képalkotás különösen alkalmas az SD és a csatolt CBF változás időbeli kapcsolatának pontos tisztázására. Ennek szemléltetésére egy látótérben két ROI-t vettünk fel; az SD kiváltási helyétől mérve a ROI1 közelebb, 2,0 mm-re, a ROI2 távolabb, 2,5 mm-re helyezkedett el. A ROI1-re nézve a CBF változás az SD-hez képest $21,3 \pm 5,9$ másodperccel később, míg a ROI2 esetén a késés $13,5 \pm 5,5$ másodpercre csökkent ($n=6$, $p < 0,04$). Méréseink azt sejtetik, hogy az SD terjedése során a csatolás időbelisége nem állandó; az SD fókuszától távolodva az SD-t követő CBF változás rövidebb latenciával alakulhat ki az SD-hez képest. Az ilyen és ehhez hasonló jellemzők az itt bemutatott duális képalkotás révén érhetőek tetten.

Mint minden kísérleti módszernek, a bemutatott duális képalkotásnak is vannak korlátai. Bár LASCA alapú CBF térképeket intakt vagy elvékonyított koponyaacsonton keresztül is létre lehet hozni,^{15,233} az RH-1838 bemosásához és fluoreszcenciájának akadálymentes regisztrálásához koponyaablak kialakítása és a dura eltávolítása szükséges. Ennek egyik következménye, hogy a megnyitott koponyaacsont hőveszteséget okoz, ami miatt az agykéreg hőmérséklete a fiziológiásnál valamennyivel alacsonyabb értéket vesz fel. Kísérleteinkben a koponyaablakba beépített hőmérő szerint az ablakot megtöltő aCSF 35 °C-os volt, míg a testhőmérsékletet rektális hőmérővel visszacsatolt melegítőpárnával 37 °C-on tartottuk. Ez az enyhe kérgi hipotermia iszkémiás állapotokban neuroprotektív tulajdonságú lehet,⁴²¹ bár az SD kialakulására, úgy tűnik, nincs számottevő kihatással.³²⁹ Egy másik, a preparátumban potenciálisan neuroprotektív körülmény lehet, hogy a koponyaablakon normoglikémiás és oxigenált aCSF-et áramoltattunk át, mely enyhén kompenzálhatja a létrehozott iszkémiát. Mindezeket figyelembe véve, a koponyaablakot iszkémiás modellben alkalmazva az SD-k feltételezett neurodegeneratív hatása mérsékeltebb lehet a reálisan elvárhatónál.

Egy másik megfontolásra érdemes körülmény az, hogy az optikai jelek a kéreg milyen mélységéből származnak. A fény annál mélyebbre hatol a szövetbe, minél szélesebb a hullámhossza. A rendszerünkben a LASCA-hoz használt 785 nm hullámhosszú, közel infravörös lézer fény korábbi megfigyelések szerint körülbelül 500 μm mélyre jut le a kéreg felszíne alá.²⁷⁵ Az előző fejezetben megállapítottuk, hogy az RH-1838 a kéreg felső 700 μm vastag rétegében halmozódik fel, legintenzívebben a felszín alatti 100-200 μm mélységű szövetréteget jelöli (4.1.6. ábra). A hozzá tartozó gerjesztő piros fény ($\lambda=620-640$ nm) becsült útja a kéregben maximum 300-350 μm lehet, tekintve, hogy a fentebb említett közel infravörös fény ($\lambda=780$ nm) 0,5 mm mélyre jut le, míg az 543 nm hullámhosszú zöld fény ennek az útnak csak a felét teszi meg.²⁷⁵ Ezek alapján nem zárható ki, hogy a képalkotással nyert mezőpotenciál és CBF szignál nem teljesen azonos kérgi mélységből származik. Ennek a körülménynek akkor van jelentősége, ha az SD a kéreg különböző rétegeiben eltérő módon terjed, és a csatolt CBF válaszreakciónak ennek függvényében eltérő a kinetikája. Az SD rétegfüggő terjedésére egy korábbi tanulmányban a kéreg különböző mélységeiből elvezetett DC potenciál kinetika hozott példát. A túsúrással kiváltott SD-k közül volt olyan esemény, mely a patkány agykéregnek csak az 1200 μm feletti rétegeiben terjedt, illetve olyan SD-t is regisztráltak, amely csak a 800 μm alatti szöveti zónában jelent meg.³⁰⁸ Az esetek többségében azonban az SD terjedésében a teljes kéreg mélysége egységesen részt vett.³⁰⁸ Összefoglalva, optikai képalkotó rendszerünk tehát a szövet felszíni, hozzávetőlegesen 300-500 μm vastag rétegről, az ebben a szöveti sávban terjedő SD-kről szolgáltatt megfizhető információt.

4.2.2. Az agyi vérvolumen és hemoglobin deszaturáció lokális változásainak nyomon követése: multi-modális képalkotás

Háttér

A képalkotó eljárás továbbfejlesztése a CBV és a hemoglobin szaturációjának a mezőpotenciállal és CBF-el szinkron megjelenítésére, illetve lehetséges optikai melléktermékek kiszűrésére irányult. A vizsgálat tárgyaként a keringés hirtelen szívmegálláskor bekövetkező leállítását, és a pár perces késéssel jelentkező, spontán kialakuló SD jelenségét választottuk. A modell előnye, hogy a keringés leállása markáns, jól reprodukálható hemodinamikai változást okoz a szövetben, amely lehetőséget teremt az optikai jelek megfelelő értelmezésére. A spontán kialakuló SD továbbá megjeleníti az iszkémiás mag régióban, vagy anoxiás szövetben lezajló jelenség lefolyását.

Módszerek

Hím, felnőtt Wistar patkányok (500-560 g) parietális kérge felett a fentebb bemutatottak szerint készítettük zárt koponyaablakot (n=10) (Isd. 4.1.2. fejezet). A bal *vena femoralis*-ba polietilén kanült helyeztünk, hogy a kísérlet egy későbbi, meghatározott szakaszában 0,5 ml levegő vagy 1 M KCl beinjektálásával hirtelen szívmegállást idéztünk elő. A bal *arteria femoralis*-t is megkanuláltuk az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure, MABP) invazív mérésére. A kérgi szövetet a beállított protokoll szerint feszültségfüggő festékkel (RH-1838) töltöttük fel (Isd. 4.1.2. fejezet) (n=6). Kontrollként aCSF-et keringettünk a koponyaablakban az RH-1838 oldat feltöltésével megegyező áramlási sebességgel (n=4).

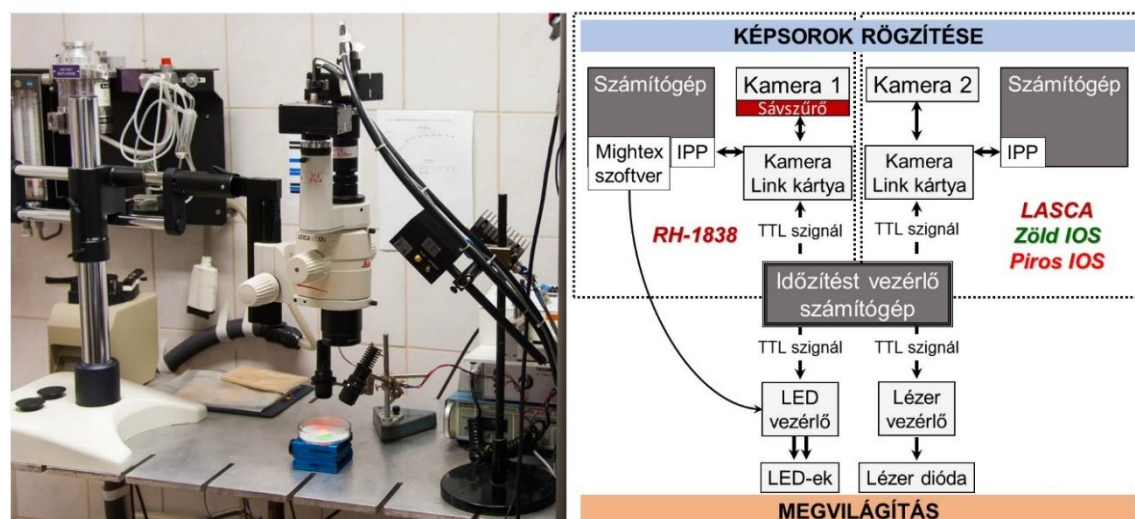
A kísérletek során 20 perces képsorokat rögzítettünk úgy, hogy 10 perces alapszakasz felvétele után okoztunk hirtelen szívmegállást. A 10 perces alap első 5 perce után az aCSF keringetését a koponyaablakban leállítottuk, és a koponyaablak kivezető csövét elzártuk. A zárt folyadékter megakadályozta, hogy a szívmegállást követő agyi ödéma miatt az agyfelszín számottevően kimozduljon a kamerák fókuszából (szabad kivezető nyílású koponyaablakban az agy kidagadásának a nyomás nem szab megfelelő határt, és a kamerák rögzített fókusz távolsága valamint az agyfelszín kidomborodása miatt a felvett képek életlenekké válnak).

Az RH-1838 és CBF képalkotást a fentebbiek szerint végeztük (4.2. fejezet). A CBV relatív változásainak becslésére a látóteret felvillanó zöld LED fényforrással világítottuk meg, másodpercenként 100 ms hosszan (csúcs-hullámhossz: 530 nm, SLS-0304-A, Mightex Systems, Pleasanton, CA, U.S.A.). A LED elé optikai sávszűrőt helyeztünk a hemoglobin izobesztikus pontjára fókuszálva (540-550 nm, 3RD540-550, Omega Optical Inc. Brattleboro, VT, U.S.A.). A visszaverődő zöld fény alapján a második, LASCA-ra használt kamera készített képsorokat 100 ms-os expozíciós idővel.

A hemoglobin deszaturációjának meghatározásához az RH-1838 gerjesztő fényforrását, a piros LED-et használtuk (maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz: 625 nm; SLS-0307-A, Mightex, Pleasanton, CA, U.S.A.) 620-640 nm-es sávszűrővel (620-640 nm; 3RD620-640, Omega Optical Inc., U.S.A.) kiegészítve. A visszavert piros fény alapján a második kamera készített képeket (az első kamera az RH-1838 fluoreszcencia felvétele miatt sávszűrővel volt felszerelve). A megvilágítás a piros LED esetében is felvillanó üzemmódban történt másodpercenként 100 ms-ig (ami egyezett az RH-1838 gerjesztésével), de a kamera expozícióját rövidebb időtartamra, 10 ms-ra állítottuk be, hogy elkerüljük a piros IOS képek kiégését.

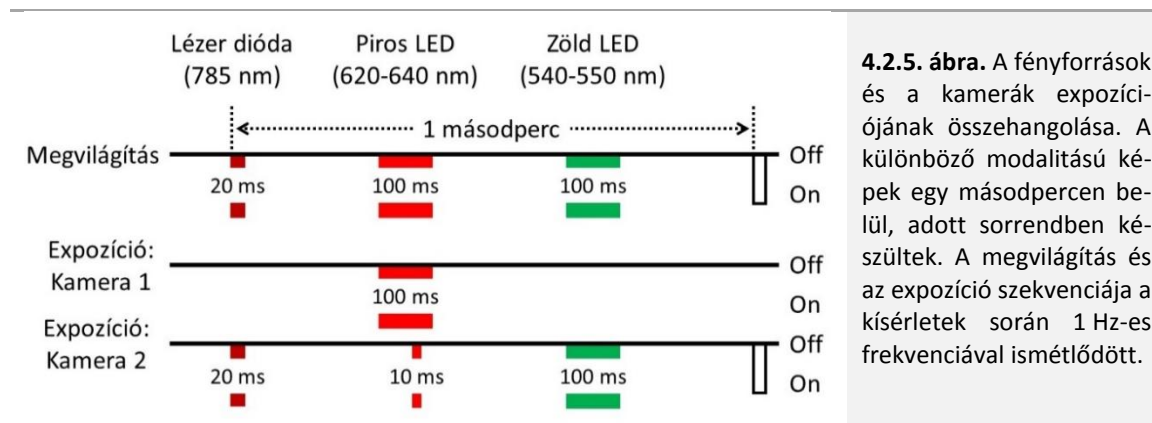
A kialakított multi-modális képalkotó rendszer tehát egy sztereomikroszkópból (MZ12.5, Leica Microsystems UK Ltd., Milton Keynes, U.K.), az ehhez csatlakoztatott két kamerából (Pantera 1M30, Dalsa, Gröbenzell, Németország), a két LED fényforrásból (Mightex, Pleasanton, CA, U.S.A.), és egy lézer diódából állt (Sanyo DL7140-201S; 70 mW; 785 nm). Az eszközök együttes,

összehangolt működését három számítógép vezérelte (4.2.4. ábra). Az első kamera csak az RH-1838 fluoreszcenciát rögzítette, a jel erősítése érdekében 2×2 binning módban (képek mérete: 512×512 pixel, azaz $3,8 \times 3,8$ mm; térbeli felbontás: $7,42 \mu\text{m}$). A második kamera 1×1 binning mellett, a kamera maximális képfelbontását kihasználva vette fel a LASCA, a zöld, illetve piros IOS képeket (képek mérete: 1024×1024 pixel, azaz $3,8 \times 3,8$ mm; térbeli felbontás: $3,14 \mu\text{m}$). Ebben az esetben a maximális felbontásra a LASCA érdekében volt szükség. A képek felbontását feldolgozás után 512×512 pixelre csökkentettük, hogy az RH-1838 képekkel közvetlenül összehasonlíthatóak legyenek. Mivel a két kamera egyazon sztereomikroszkóphoz volt rögzítve, a felvételeket ugyanarról a látótérről, azonos nagyítással készítették. A kamerákat egy-egy ImagePro-Plus szoftverrel ellátott Kamera Link kártyán (Phoenix, PHX-D24CL; Active Silicon Ltd., Uxbridge, U.K.) keresztül csatlakoztattuk a számítógéphez. Az eszközök összehangolt működését egy harmadik, input/output kapacitással és két digitális/analóg csatornával rendelkező számítógép vezérelte (Metrabyte DAS-20, ASYST Macmillan szoftver alatt futtatva; Keithley Instruments Inc., Reading, U.K.). A vezérlő számítógép TTL szignálok segítségével kommunikált a kamerákkal és a fényforrásokkal; a kamerák expozícióját a Kamera Link kártyán keresztül, a fényforrások felvillanását a hozzájuk rendelt vezérlőkön keresztül időzítette (4.2.4. ábra).



4.2.4. ábra. A multi-modális képalkotó rendszer alkotóelemei, és azok „kapcsolási” rajza. Rövidítések: IOS: visszavert fény (intrinsic optical signal), IPP: ImagePro-Plus szoftver, LASCA: lézer-folt interferencia kontraszt analízis (laser speckle contrast analysis), RH-1838: feszültségfüggő festék fluoreszcenciája

A fényforrások és a kamerák expozíciójának összehangolását úgy állítottuk be, hogy mind a négy modalitásról (RH-1838, LASCA, zöld IOS és piros IOS) másodpercenként egy felvétel készüljön (4.2.5. ábra), tehát a mintavételezési frekvencia minden modalitásra nézve 1 Hz volt. A fényforrásokat a preparátum körül úgy rendeztük el, hogy a fénynyalábokat egymással átfedésben a koponyaablakra fókuszáltuk. A megvilágítás egyenletességét a felvételek megkezdése előtt számítógép-képernyőn, valós időben, az ImagePro-Plus szoftver segítségével ellenőriztük.

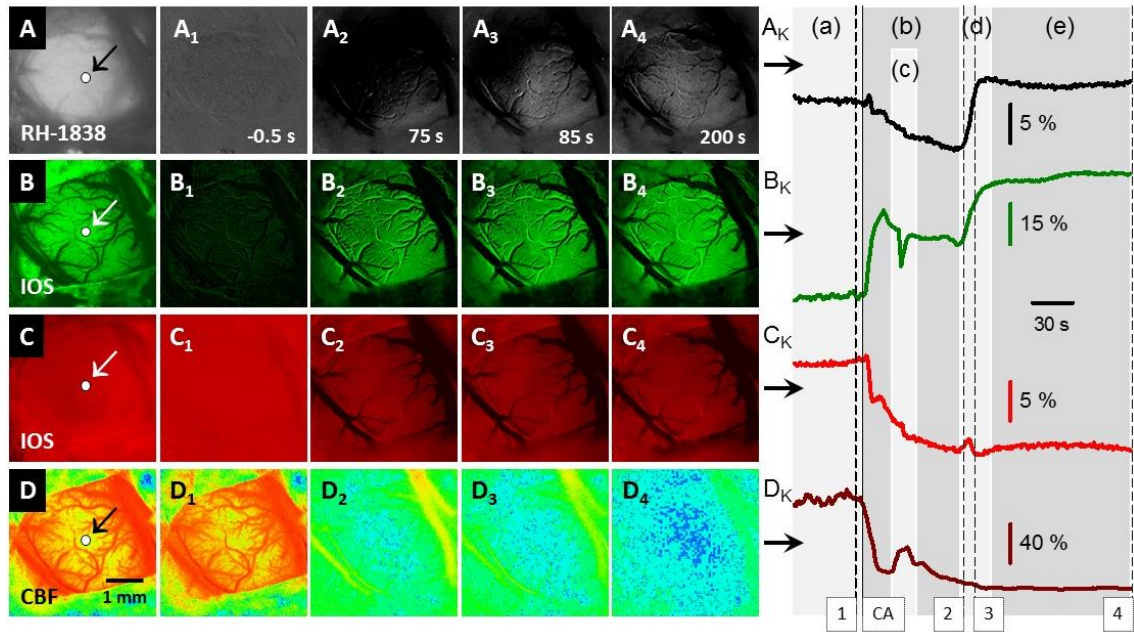


Az intenzitás-adatok kiolvasása és feldolgozása megegyezett a fentebb leírtakkal (4.2.1. fejezet), azzal a különbséggel, hogy a kiválasztott ROI-kat most a négy, egymással szinkron készült modalitáson alkalmaztuk (mezőpotenciál, CBF, CBV, hemoglobin-szaturáció).

Kihasználva a zöld IOS képek erős kontrasztját, lehetőségünk nyílt a piális arteriolák átmérőjének mérésére is. Az érátmérő-változások analizéséhez 250 s hosszú képsorokat jelöltünk ki úgy, hogy a szívmegállás után, spontán jelentkező SD a szekvencia közepére essen. Az analizéshez a zöld IOS képek eredeti, maximális felbontását (1024 × 1024 pixel) vettük alapul. A képek további feldolgozását és magát az érátmérő-mérést ImagePro-Plus szoftverben végeztük. Az analizéshez jellemzően 60-100 μm alapátmérőjű piális arteriolák elágazásmentes szakaszát választottuk. A teljes látóteret lefedő képekből kivágtuk a kiválasztott érszakaszra eső területet, és úgy forgattuk, hogy az érszakasz a képernyőn vízszintesen jelenjen meg. A háttér normalizálása után, a sötét ér és a világos háttér kontrasztjának érzékelése alapján egy ImagePro-Plus-ban írt macro számította minden egyes képkockára nézve az érátmérőt.

Eredmények, és azok értelmezése

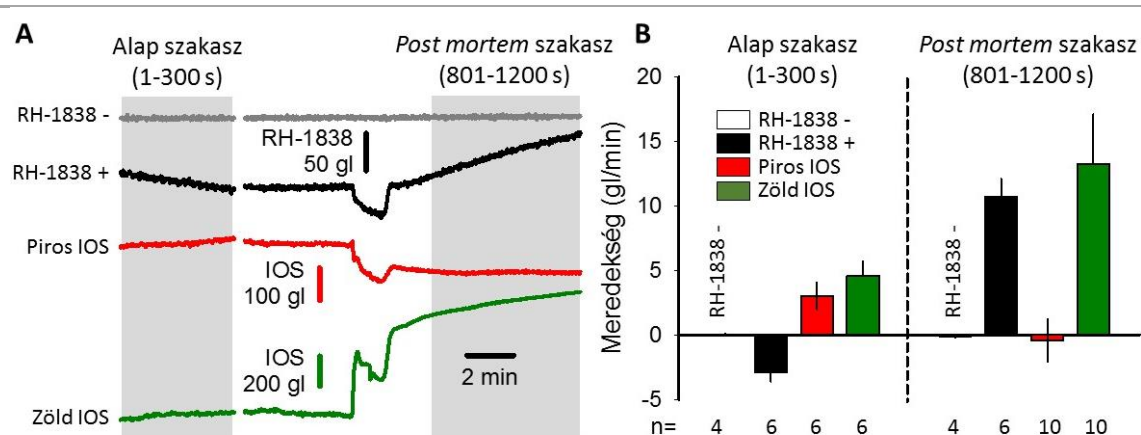
A felvett képsorokból nyert optikai intenzitásváltozások alapján a kísérleteknek öt, egymást követő fázisát különítettük el. Ezek sorrendben a következők: az alap szakasz (a felvételek első 5 perce, azaz 300 s); hirtelen szívmegállás; a keringés rövid, átmeneti visszatérése; SD; és az SD-t követő, *post mortem* változások (azaz a felvételek utolsó, ~6,5 perce, pontosan 400 s). Az optikai jelek változásait és a megállapított fázisokat a 4.2.6. ábra szemlélteti. Az áttekinthetőség érdekében az öt fázisra vonatkozó eredményeket a továbbiakban külön elemezzük és értelmezzük.



4.2.6. ábra. Reprezentatív képsorok a hirtelen szívmegállás (cardiac arrest, CA) és a terminális, terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) alatti változások szemléltetésére a négy, párhuzamos modalitással. A_1-4 és A_K : a feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának mezőpotenciállal összefüggő intenzitás-változása; B_1-4 és B_K : a szöveti térfogatával korreláló, visszaverődő fényintenzitás (intrinsic optical signal, IOS) zöld megvilágítás ($\lambda=540-550$ nm) mellett; C_1-4 és C_K : a hemoglobin deszaturációját jelző IOS piros ($\lambda=620-640$ nm) megvilágítás mellett; D_1-4 és D_K : lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (LASCA) nyert agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) térképek. A bal szélső, számozatlan felvételek (A, B, C, D) a látóteret mutatják be a négy modalitás tekintetében röviddel az RH-1838 inkubációt követően. A nyíllal jelölt kör az intenzitás-változások kiolvasására kiválasztott, érdeklődési területet (region of interest, ROI) illusztrálja. Az A_1-4 , B_1-4 , és C_1-4 képeket háttérkivonással, és a kontraszt fokozásával kaptuk. A CBF térképek (D_1-4) képsorait 7 pontos mozgóátlaggal simítottuk. A monokróm kamerák által készített fekete-fehér felvételeket a B, C és D sorozaton szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. A D sorozat képein melegebb színek jelölik a magasabb áramlási viszonyokat. Az A_1-4 képek jobb alsó sarkában jelölt időt a szívmegálláshoz képest tüntettük fel. A jobb szélén bemutatott grafikonok (A_K , B_K , C_K , D_K) az eredeti, nyers képekből a ROI-val kiolvasott intenzitás-változások kinetikáját ábrázolják. A szürke árnyalt sávok a felvételek következő fázisait különítik el: (a): alap szakasz, (b): hirtelen szívmegállás, (c): a keringés rövid, átmeneti visszatérése, (d): SD, (e): az SD-t követő, *post mortem* változások. A számozott, függőleges, szaggatott vonalak a bemutatott képek mintavételi helyét adják meg (a számok a reprezentatív képek jelölésében az alsó indexének felelnek meg); a folytonos, függőleges vonal a hirtelen szívmegállást (CA) jelzi. Az intenzitás-változásokat az összehasonlíthatóság érdekében relatív formában fejeztük ki.

Az alap szakaszban meghatároztuk az RH-1838 festék fakulását, és ennek lehetséges hatását a zöld és piros IOS intenzitására. Utóbbi feltételezésünk abból indult ki, hogy az RH-1838 fakulása vagy kimosódása révén maga a festék kevesebb fényt nyel el, így az RH-1838 fluoreszcenciájának gyengülésével az IOS intenzitásának elviekben emelkednie kell. Az optikai jelek fokozatos intenzitás-változását az alap szakaszra (1-300 s) számított meredekséggel jellemeztük, és a képeken mért szűrkeszint egy percre vonatkozó eltéréseként adtuk meg (gl/min; $\text{átlag} \pm \text{stdev}$). Várakozásainkkal és korábbi eredményeinkkel (4.1.1. fejezet) összhangban az RH-1838 intenzitása fokozatosan, lineárisan csökkent ($-2,91 \pm 0,74$ gl/min; **4.2.7. ábra**). Ugyanakkor a piros és a zöld IOS meredeksége ugyanazon szakaszon az RH-1838-hoz hasonló nagyságrendű, de pozitív irányultságú volt ($5,43 \pm 0,67$ és $6,07 \pm 1,58$ gl/min, piros és zöld IOS; **4.2.7. ábra**). Összehasonlításként, azokban a kísérletekben, amelyeknél az RH-1838-at elhagytuk, a piros és zöld IOS intenzitása egyenletes, változatlan maradt az alap szakasz alatt. A megfigyelések alapján arra

következtettünk, hogy az RH-1838 fluoreszcenciájának gyengülése (fakulás vagy kimosódás révén) a piros és zöld IOS intenzitásának progresszív fokozódásához vezet. Ezek alapján a kísérletek későbbi szakaszaira vonatkozó IOS intenzitásváltozásokat, az alap szakaszra megállapított meredekséget (és tengelymetszetet) felhasználva, minden egyes regisztrátum feldolgozása során korrigáltuk.



4.2.7. ábra. Optikai intenzitás-változások a kísérletek alap és *post mortem* szakaszában. **A:** A reprezentatív vonaldiagramok az optikai jelintenzitásokat szemléltetik egy kiválasztott kísérlet során. A törés előtti, alap szakasz a nyers, korrekciótól mentes állapotot ábrázolja. A felvételek törést követő, teljes hosszán, az alap szakaszra számított meredekséget és tengelymetszetet felhasználva, lineáris korrekciót hajtottunk végre; a bemutatott diagramok törést követő szegmense tehát a korrigált adatsort ábrázolja. **B:** Az oszlop diagram a nyers alap és a korrigált *post mortem* szakaszra vonatkozó meredekségértékeket (átlag \pm s.e.m.) tünteti fel az A panelen szürke háttérrel kiemelt időtartamokra vonatkoztatva. Rövidítések: gl: szürkeszint (gray level), IOS: visszavert fény (intrinsic optical signal), RH-1838: feszültségfüggő festék fluoreszcencia-intenzitása (a rövidítést követő negatív jel a festékmentes, a pozitív jel a festékekkel inkubált kísérleteket különbözteti meg).

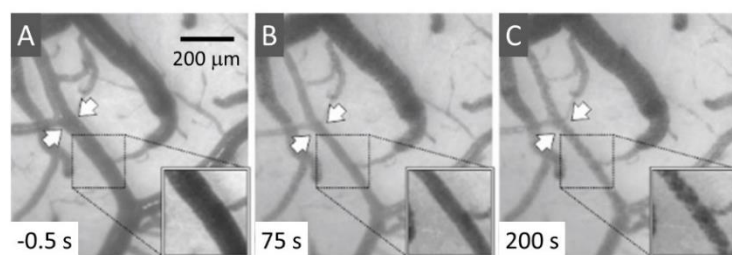
A kísérletek második szakaszaként a szív megállással együttjáró változásokat határoztuk meg (**4.2.6. ábra**). Az 1 M KCl oldat intravénás injekciójával kiváltott szív megállást a MABP meredek esése igazolta (82 ± 3 Hgmm-ről 12 ± 3 Hgmm-re, azaz a töltési nyomásra). A vérnyomásesést követve a piális arteriolák átmérője számottevően csökkent (68 ± 5 μ m-ről 45 ± 3 μ m-re; **4.2.8.** és **4.2.9. ábra**), de az erek lumene nem esett össze. Ez azt jelzi, hogy a piális arteriolák lumene az arteriolák jelentős miogén tónusa miatt kicsi töltési nyomás mellett is megtartott. A legkisebb érátmérőt a szív megálláshoz képest $7,5\pm 0,7$ s késéssel mértük. A vérnyomás és az arteriolák átmérőjének csökkenését követve a CBF is fokozatosan esett (**4.2.9. ábra**). Az arteriolák kaliberének szív megállással összefüggő változására több, lehetséges magyarázatot mérlegeltünk. Egyrészt felvetettük az aktív vazokonstriktió lehetőségét, másrészt fontolóra vettük az arteriolák passzív érátmérő-csökkenését.

A kálium extracelluláris koncentrációjának 20 mM-t meghaladó emelkedése markáns érösszehúzóást okoz.²¹⁴ Mivel az anoxiás állapotokban kialakuló SD során az extracelluláris kálium koncentrációja jóval meghaladja a 20 mM-t,⁹ feltételezhető, hogy az eseményhez vazokonstriktió társul.³⁴⁴ Azonban az érátmérő itt megfigyelt csökkenése több, mint egy perccel megelőzte az SD-t, így az SD-vel járó káliumszint-növekedés nem hozható kapcsolatba az arteriolák szív megállást követő beszűkülésével.

Felmerül annak a lehetősége is, hogy a szív megállítása céljából, vénásan beadott KCl az agyi érhálózatba jutva fejtett ki érösszehúzó hatást. Ennek azért kicsi a valószínűsége, mert ha embolizációval, levegő bejuttatásával állítottuk meg a szívet, a piális arteriolák átmérőjének

csökkenését ugyanúgy megfigyeltük, tehát a keringésbe juttatott KCl hiányában is reprodukálható volt a jelenség. A legvalószínűbb elképzelés szerint a piális erek a vérnyomás és az áramlás hirtelen, drasztikus csökkenésének következtében követték a nyomás- és áramlási viszonyokat.

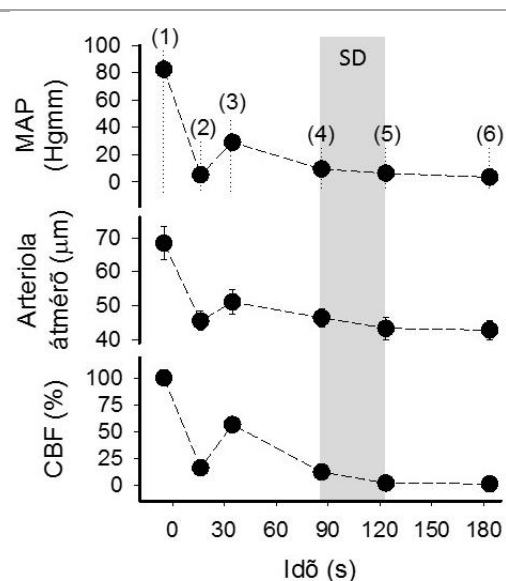
A szív megállás során az IOS és RH-1838 optikai jelekre nézve a következő megállapításokat tettük. A vérnyomás, a CBF és az arteriolák átmérőjének csökkenésével a zöld IOS intenzitása jelentősen, átlagban 297 ± 28 gl-el emelkedett (**4.2.6. ábra**). Mivel a zöld megvilágítás a hemoglobin izobesztikus pontját ($\lambda=540-550$ nm) célozta, a zöld IOS intenzitásának fokozódása a CBV csökkenését jelezte.^{53,54} Ezek alapján elmondható, hogy a kísérletünkben kiváltott kardiovaszkuláris elégtelenség következtében, az agyi erek lumenátmérőjének csökkenésével összhangban a CBV is csökkent.



4.2.8. ábra. Egy piális arteriola átmérőjének szív megállással összefüggő csökkenése (B), és a vörösvértestek későbbi aggregációja (C) zöld megvilágításnál készült, reprezentatív felvételeken. A képek bal alsó sarkában jelölt időt a szív megálláshoz képest tüntettük fel.

A piros IOS intenzitása – a zölddel ellentétben – a szív megállást követően meredeken csökkent ($-46 \pm 7,6$ gl; **4.2.6. ábra**). Ez arra enged következtetni, hogy a CBV változása piros megvilágítás mellett elenyésző mértékben járul hozzá az IOS intenzitásához, valószínűleg azért, mert az adott hullámhossztartományban ($\lambda=620-640$ nm) a hemoglobin fényelnyelése igen alacsony a zöld tartományhoz ($\lambda=540-550$ nm) képest (**4.2.1. ábra**). Azonban 620-640 nm hullámhosszon a deszaturált hemoglobin fényelnyelése arányaiban számottevően meghaladja az oxigenált hemoglobint (**4.2.1. ábra**), így szív megállás után a piros IOS intenzitásának hirtelen esése nagy valószínűséggel a deoxigenált hemoglobin arányának emelkedését, azaz a hemoglobin deszaturációját tükrözi.

A piros IOS intenzitásának csökkenésével párhuzamosan, a neuronális transzmembrán-potenciáltól függetlenül, az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitása is mérséklődött a szív megállással ($-18 \pm 4,1$ gl; **4.2.6. ábra**). Lényeges megjegyezni, hogy a piros fény ($\lambda=620-640$ nm) az RH-1838 gerjesztő hullámhossza. Amennyiben a gerjesztő fényt a deszaturálódó hemoglobin egyre hatékonyabban nyeli el (ahogy azt a piros IOS mutatta), kisebb intenzitás jut a festék gerjesztésére, ami gyengébb fluoreszcenciát vonhat maga után. A fluoreszcencia mérséklődéséhez hozzájárulhat az is, hogy a deszaturált hemoglobin a fluoreszcencia hullámhossztartományában ($\lambda=670-740$ nm) is elnyeli a fényt (**4.2.1. ábra**). Összegezve: a feszültségfüggő festék fluoreszcencia-intenzitását a mezőpotenciál-változásoktól függetlenül gyengítheti a hemoglobin deszaturációja. Ez az SD-k detektálását azonban nem befolyásolja számottevően, hiszen a hemoglobin teljes deszaturációja az RH-1838 fluoreszcenciájában <20 gl intenzitásemelkedést okoz, míg az SD ~ 140 gl intenzitásemelkedéssel jár (lsd. **4.2.1. fejezet**).



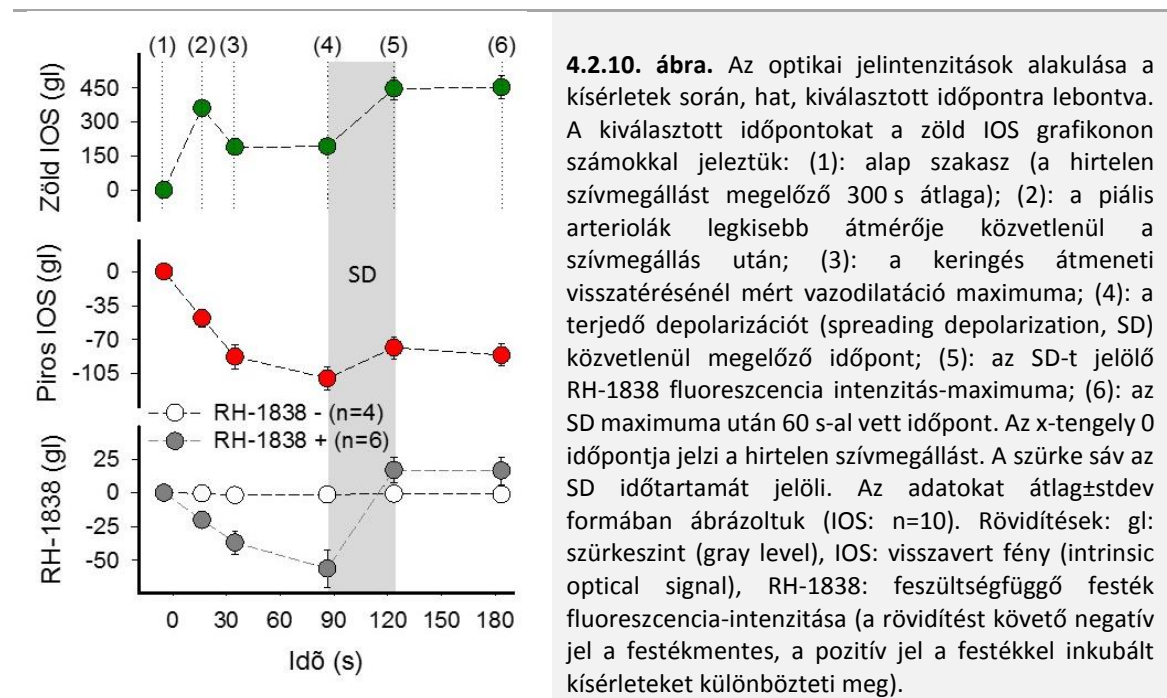
4.2.9. ábra. A szisztémás és agyi keringés élettani változóinak alakulása a kísérletek során, hat, kiválasztott időpontra lebontva. A kiválasztott időpontokat az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure, MABP) grafikonon számokkal jeleztük: (1): alap szakasz (a hirtelen szívmegállást megelőző 300 s átlaga); (2): a piális arteriolák legkisebb átmérője közvetlenül a szívmegállás után; (3): a keringés átmeneti visszatérésénél mért vazodilatáció maximuma; (4): a terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) közvetlenül megelőző időpont; (5): az SD-t jelölő RH-1838 fluoreszcencia intenzitás-maximuma; (6): az SD maximuma után 60 s-al vett időpont. Az x-tengely 0 időpontja jelzi a hirtelen szívmegállást. A szürke sáv az SD időtartamát jelöli. Az adatokat átlag \pm stdev formában ábrázoltuk (n=10). Rövidítések: CBF: agyi vérátáramlás (cerebral blood flow).

Körülbelül fél perccel a szívmegállás után ($34,6 \pm 4,5$ s) a MABP, az arteriolaátmérők, és a CBF rövid időre ismét emelkedett (**4.2.6.** és **4.2.9. ábra**), melyet a keringés átmeneti visszatéréseként értelmeztünk. Azt feltételezzük, hogy a vénásan beinjektált, magas koncentrációjú KCl a szívet elérve azonnal megállította a szív működését, de az ingerképző rendszer kis idő elteltével még néhány szívösszehúzódást kiváltott, mielőtt a szív pumpafunkciója teljesen megszűnt.

A jelenséggel párhuzamosan az optikai jelintenzitások csökkentek. A zöld IOS intenzitásának hirtelen, számottevő esése ($172,5 \pm 23,7$ gl; **4.2.6.** és **4.2.10. ábra**) legnagyobb valószínűséggel a CBV átmeneti emelkedését jelezte, amely értelemszerűen következik a MABP, az arteriolaátmérő, és a CBF ebben az időben tapasztalt növekedéséből.

A piros IOS és az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitása kisebb mértékben ugyan, de szintén gyengült (piros IOS: $-87,4 \pm 12,6$ gl, RH-1838: $-36,8 \pm 8,8$ gl; **4.2.6.** és **4.2.10. ábra**). Úgy gondoljuk, hogy az agyi érhálózatban megrekedt vérben a hemoglobin erre az időpontra már teljes mértékben deszaturálódott, így a keringés visszatérésekor az oxigenált forma minimálisra csökkent. Ilyen feltételek mellett a hemoglobin deszaturációja már nem fokozható, a piros IOS intenzitás gyengülése a CBV változásait kell, hogy kövesse. Ezért a keringés rövid visszatértekor a piros IOS intenzitás csökkenése – a zöld IOS-hez hasonlóan – arányos kellett, hogy legyen a CBV emelkedésével. Ahogy a szívmegállás kapcsán részleteztük, az RH-1838 jelintenzitása a piros IOS-t követte, az RH-1838 gerjesztő fényének és emittált fluoreszcenciájának megnövekedett abszorpciója miatt.

Az adatok analízise és értelmezése igazolta, hogy a zöld IOS elsősorban a CBV-re érzékeny. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy olyan állapotokban, amikor a hemoglobin feltehetően teljes mértékben deszaturálódott, a piros IOS is a CBV változásait tükrözi. Ezek a megállapítások fontosak az optikai jelek értelmezéséhez iszkémiás vagy anoxiás kísérleti modellek alkalmazása esetén, amikor súlyos metabolikus krízis lép fel a szövet egyes területein.



A felvételek következő szakaszában kialakuló SD a látótér fronto-laterális sarkából a dorso-mediális irányba tovaterjedő hullámként jelentkezett (**4.2.6. ábra**), és $4,5 \pm 0,4$ mm/min terjedési sebességgel haladt. A hullámfrontot az RH-1838 fluoreszcenciájának meredek emelkedése jelezte ($72,9 \pm 4,1$ gl), mely a szív megállást követően 1-2 perccel ($83,8 \pm 6,1$ s) lépett be a látótérbe (**4.2.6.** és **4.2.10. ábra**). Mivel ebben az időpontban a hemodinamikai jellemzők (MABP, arteriolaátmérő, CBF és CBV) már megközelítőleg megállapodtak a minimum értéknél, az RH-1838 valós membránpotenciál-változásokat kellett, hogy mutasson.¹⁴⁹ A megfigyelt SD után repolarizáció nem következett be: az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitása a megemelkedett szinten maradt (**4.2.6.** és **4.2.10. ábra**). Meggyőződésünk szerint a megfigyelt SD azonos a korábban anoxiás depolarizációként megismert jelenséggel, azaz a sejtek ionháztartásának visszafordíthatatlan felborulásával. Meglátásunkat támasztja alá, hogy az SD jól reprodukálható időbeli kialakulása (i.e. 1-2 perccel a szív megállás után) egyezik az anoxiás depolarizáció latenciájával.^{82,418} Fontos, új eredménynek tartjuk, hogy a képző eljárás tanúbizonyosága szerint a terminális depolarizáció egy térben terjedő jelenség, és nem egyazon időpontban jön létre az agykéreg minden egyes területén. Eredményeink lényeges sarokpontját képezik annak az évekkel később kialakult nézetnek, mely szerint a külön jelenségekként számon tartott anoxiás depolarizáció, peri-infarktus depolarizáció, iszkémiás depolarizáció és SD ugyanazon ideglettani folyamat manifesztációja egy jól meghatározható spektrum mentén.^{107,164} A spektrum végpontjaiként határozható meg egyrészt az olyan SD, melyet repolarizáció nem követ („anoxiás depolarizáció”), másrészt az intakt kéregben lezajló, rövid, tranzienst SD.¹⁷⁸ A felvázolt koncepciót az 5.2. fejezetben tárgyaljuk részletesen.

Kísérleteinkben az SD során, az RH-1838 fluoreszcenciához hasonlóan, a piros és zöld IOS intenzitása is jól kivehetően növekedett (**4.2.6.** és **4.2.10. ábra**). A zöld IOS intenzitás-emelkedését ($229,8 \pm 36,4$ gl) minden kísérletben megfigyeltük. A piros IOS SD-vel összefüggő változása kisebb mértékűnek bizonyult, és kinetikája kísérletről-kísérletre nagyobb változatosságot mutatott. A változatosságot az RH-1838 jelenlétének tulajdonítottuk, hiszen a festék elhagyásával végzett kísérletekben a piros IOS intenzitása határozottabban, meredekebben emelkedett ($45,1 \pm 8,3$ gl, n=4) az RH-1838-al inkubált kísérletekhez képest ($22,5 \pm 11,5$ gl, n=6; **4.2.6. ábra**).

Mérlegelve a korábbi megállapítást, hogy a hemodinamikai változók a kísérletek ezen szakaszában már a minimumértékekhez közel megállapodtak, okkal feltételezhető, hogy az IOS a parenchyma SD-vel összefüggő optikai jellemzőinek keringéstől független változásait tükrözte. Az *in vitro* csirke retina preparátumon végzet kísérleteink (4.1.1. fejezet), és más kutatócsoportok eredményei is alátámasztják ezt a nézetet,⁷⁶ hiszen az érmentes csirke retinán az SD áthaladása a megváltozott fénytörés miatt szabad szemmel is látható. Hasonlóképpen, *in vitro* patkány agyszereleten végzett kísérletek tanúsítják, hogy a szereleten áthaladó fény szóródását az SD megváltoztatja.^{78,197} A szövet SD-okozta megváltozott fénytörő tulajdonságának hátterében az SD-vel fellépő ionáramok állnak, melyek az extracelluláris tér beszűkülésével párhuzamosan¹⁵⁶ a sejtek térfogatnövekedését vonják maguk után. A legfrissebb kutatások szerint az SD során elsősorban a neuronok duzzadnak meg,⁴²⁵ ami nem csak a szómán, hanem a neuronok dendritfáján is észlelhető („dendritic beading”)³¹¹ a Cl⁻ ion extracelluláris jelenlétének függvényében.³⁵⁶ Végezetül a kéreg optikai tulajdonságait a sejtek duzzadásán túl a terminális SD során befolyásolhatja a citokróom C oxidáz állapota is, mivel az aktív centrumokban található Fe⁺³ (hem) és Cu²⁺ ionok redukciója megváltoztatja a szövet fényelnyelési tulajdonságait.¹⁹⁹ Összefoglalva, a kísérleteinkben regisztrált, SD-vel társuló IOS intenzitásnövekedés hátterében valószínűleg az itt részletezett folyamatok érhetőek tetten, melyet a piros IOS estében tompíthat a szövetben felhalmozódott RH-1838.

A korai *post mortem* változások (a szívmegállás után fél órán belül) értékeléséhez a kísérletek végső szakaszán (i.e. 400 s) regisztrált intenzitásgörbék meredekségét vettük alapul (4.2.7. ábra). Az RH-1838 fluoreszcenciája az SD-t követően egyenletes emelkedést mutatott (10,7±1,4 gl/min). Hasonlóképpen növekedett a zöld IOS intenzitása is (13,2±3,9 gl/min), ugyanakkor a piros IOS szinten maradt (-0,4±1,7 gl/min). Itt érdemes megemlíteni, hogy a vörösvértestek aggregációja („pénztekercs képződés”) az arteriolákban az SD kialakulásakor kezdődött meg (86,1±8,4 s a hirtelen szívmegállást követően) (4.2.8. ábra). A jelenség első leírása szerint a vörösvértestek összetapadása a szívhalál utáni percekben indul meg,¹⁷¹ amivel megfigyeléseink teljes összhangban állnak. Ez a jelenség lehet az egyik oka annak, hogy a zöld IOS intenzitása az SD után fokozódott. Elképzelésünket alátámasztja a trombocita-aggregometria optikai alapelve is, mely szerint egy szuszpenzió fényelnyelése csökken, amikor a benne lévő partikulumok aggregálódnak.⁴⁶ A zöld IOS SD utáni intenzitás-fokozódásának egy másik oka lehet, hogy a sztereotaxiás befogóban az állat feje a testhez képest magasabban helyezkedett el, így a szívműködés megszűnése után a gravitációnak köszönhetően a vér fokozatosan elszivároghatott az agykéregből. Elviekben a piros IOS intenzitásának a zöldhöz hasonlóan jeleznie kellett volna az érpályában zajló *post mortem* változásokat – bár gyengébb jelintenzitás-változásokkal, hiszen a hemoglobin fényelnyelése a piros hullámhosszon nagyon alacsony a zöld hullámhosszhoz képest (4.2.1. ábra). A piros IOS azonban a *post mortem* szaksz alatt egyenletesnek mutatkozott. Az SD kapcsán fentebb megfigyeltük, hogy az ozmotikus viszonyok változását a zöld IOS jól követi, míg a piros IOS kevésbé érzékeny rá (4.2.6. ábra). Ez alapján a zöld IOS intenzitásának *post mortem* emelkedésére valószínűbb magyarázat a szöveti homeosztázis szívmegállást követő felborulása,¹¹⁷ melynek során az ionáramok, a szöveti acidózis és a vér-agy gát funkció romlása ödémát,¹⁴⁷ így a szövet fénytörési tulajdonságainak megváltozását vonhatja maga után. Feltételezhető, hogy az RH-1838 fluoreszcenciájának *post mortem* intenzitás-fokozódása is ennek volt köszönhető, bár az adott körülmények között nem zárható ki a festék és a sejtthártya közötti interakció jellegének megváltozása sem. Ezek alapján az RH-1838 fluoreszcenciájának *post mortem* intenzitás-fokozódása a membránpotenciál-változástól független műterméknek tekintendő.

Az előző fejezetben (4.1. fejezet) megállapítottuk, hogy fiziológias körülmények között az RH-1838 alkalmas az SD képi megjelenítésére. A hirtelen szívmegállás következményeit vizsgáló kísérleteink tanulságai szerint azonban, súlyos ischémiás állapotokban az RH-1838

fluoreszcenciájának értékelésekor figyelembe kell venni az agyi áramlási viszonyok megváltozásával összefüggő, műterméket képző tényezőket. A leglényegesebb közülük az agyi érhálózatban a hemoglobin deszaturációja, mely az RH-1838 gerjesztő és emissziós spektrumának fokozott elnyelése révén csökkenti a festék fluoreszcencia-intenzitását. Az ischemia indukciója után kialakuló SD-k azonosítását ez a körülmény nem akadályozza, bár az SD-k pontos kinetikájának jellemzését jelentősen megnehezítheti.

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának SD-t tükröző változását körültekintően, a hemoglobin szaturációjának figyelembe vételével kell értékelni. A fluoreszcencia-intenzitást minimálisan torzítyják műtermékek, ha az SD áthaladásakor a szöveti mikrokerngésben a hemoglobin szaturációja megközelítőleg változatlan. Ilyen állapotnak tekintjük, amikor a szöveti perfúzió az SD bekövetkezése előtt percekkel leáll,¹⁰ és az SD kialakulását megelőzi a hemoglobin teljes deszaturációja. Az ép keringésű agykéregben is megbízhatóan jelzi az RH-1838 az SD-t, ahogy azt a fentebb bemutatott *in vitro* kísérleteink igazolták (4.1.1. fejezet). Fiziológias körülmények között, közeli infravörös spektroszkópiai vizsgálatok (near infrared spectroscopy, NIRS) szerint az SD-vel nem jár hemoglobin deszaturáció. Épp ellenkezőleg, az SD-re válaszként kialakuló hiperémia révén az oxigenált hemoglobin aránya átmenetileg megemelkedhet.⁴¹⁶ Azonban az iszkémiás penumbrán áthaladva az SD gyorsan kimeríti a hemoglobin oxigéntartalékait, ami a festék fluoreszcenciáján egy hirtelen és jelentős intenzitásvesztést okoz. A nyilvánvaló műtermékekkel későbbi munkánk során számolnunk kellett (5.3. fejezet).

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Összefoglalva, kutatási céljaink szolgálatában létrehoztunk egy olyan, multi-modális képalkotó rendszert, amely a mezőpotenciál-változásokkal szinkronban meg tudja jeleníteni az agykérgi hemodinamika jellemző paramétereit is, mint a CBF, a CBV és a hemoglobin deszaturációja. A módszer lényeges és meghatározó jellemzője, hogy az agykérgi mezőpotenciál-változásokat és a csatolt hemodinamikai eseményeket megfelelő felbontással, térben és időben egyaránt meg tudja feleltetni egymásnak. Végezetül a képalkotás alkalmazásától fokális iszkémiás modellben azt várjuk, hogy segítségével térben és időben meghatározható lesz a spontán kialakuló SD fókusza a primer iszkémiás lézióhoz képest. A módszer alkalmazása választ adhat a későbbiekben azokra a kérdésekre, hogy az iszkémiás által különböző mértékben érintett kérgi területeken az SD milyen sajátosságokat mutatva terjed, és milyen dinamikával járulhat hozzá az iszkémiás lézió növekedéséhez.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemények:

Obrenovitch TP, Chen S, Farkas E. Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods Neuroimage. 2009;45(1):68-74.

Farkas E, Bari F, Obrenovitch TP. Multi-modal imaging of anoxic depolarization and hemodynamic changes induced by cardiac arrest in the rat cerebral cortex. Neuroimage. 2010;51(2):734-42.

4.3. Az agyszöveti pH változásainak megjelenítése pH-függő festékekkel

Kísérleteink előrehaladtával megfogalmazódott az a hipotézis, hogy az SD-vel járó szöveti acidózis meghatározó szerepet tölt be az SD-vel összefüggő neurodegeneráció létrejöttében. Kérdésként vetődött fel az is, hogy iszkémiás során milyen szöveti pH viszonyok kedveznek az SD kialakulásának, vagy mutatnak egybeesést az SD terjedésével. A hipotézis igazolására és a felmerült kérdések megválaszolására kézenfekvő megközelítésnek adódott képalkotó

rendszerünk kiegészítése egy új modalitással a szöveti pH monitorozására. Olyan pH indikátor módszer kidolgozását tűztük ki célul, amely nagy érzékenysége révén alkalmas kis pH változások kimutatására, megfelelő térbeli felbontást biztosít, stabil jelet ad, jel-zaj viszonya kedvező, és a vizsgált idegéletani jelenség lefolyását nem módosítja. Kísérleteink megtervezésekor az agykérgi pH változások képi megjelenítésére vonatkozó legátfogóbb tanulmányok a vitális neutrálvörös (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin-hidroklorid; Neutral Red, NR) fluoreszcens pH indikátor festék használatára vonatkoztak,^{50,115} mely az intracelluláris pH (pH_i) csökkenését fluoreszcencia-intenzitásának fokozódásával jelzi. Az NR ideális idegszöveti pH indikátor, mert érzékenysége pH 6-8 közé esik, emissziós spektrumát más ionok koncentráció-változásai nem befolyásolják, nem toxikus az idegsejtekre nézve, valamint szisztémásan adagolható, mert lipofil tulajdonságának köszönhetően átjut a vér-agy gáton.^{22,49,217} Az NR az idegszövet sejt típusai között nem tesz különbséget; a neuronokat és a gliasejteket azonos affinitással jelöli. A festék a sejtek citoplazmájában, lizoszómákhoz és mitokondriumokhoz asszociálva halmozódik fel.²¹⁷ Az NR használatát a szöveti pH változások megjelenítésére különösen releváns megközelítésnek tekintettük, hiszen a kisgyaban a terjedő acidózis és depresszió jelenségét (mely nem azonos az SD-vel) az NR fluoreszcenciáján alapuló képalkotással azonosították és írták le.¹¹⁵

Az agyszöveti pH mérésének hagyományos, elektrofiziológiai módja az ionszenzitív mikroelektróda alkalmazása. Az extracelluláris pH (pH_e) meghatározása egy üveg mikrokapillárisba felszívott, protonra érzékeny, ioncserélő folyadékmembrán révén valósul meg.^{7,209,266} A módszer megbízható, nagyon pontos időbeli felbontással bír, és a mérések kivitelezésének technikai nehézségei ellenére évtizedek óta a legelfogadottabb eljárás az agyszöveti pH meghatározására. Ahhoz, hogy az NR-alapú képalkotással kapott eredmények hitelességét ellenőrizzük, és a képalkotó módszert validáljuk, laboratóriumunkban beállítottuk a pH-szenzitív mikroelektródák használatát is.

Módszerek

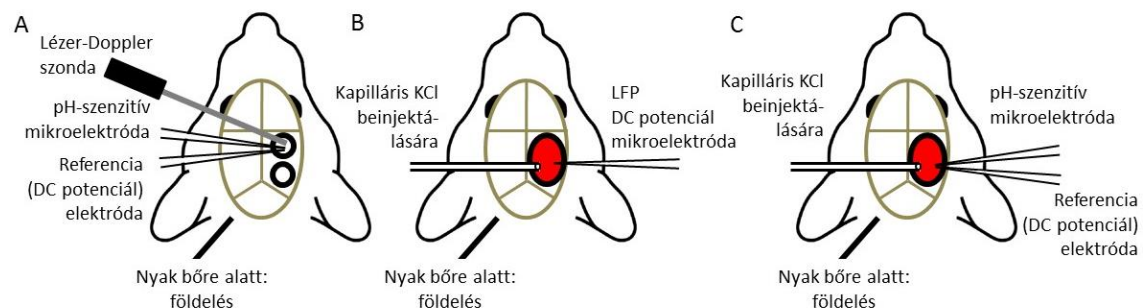
Kísérleteinkhez fiatal felnőtt (2 hónapos, $n=20$), hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat spontán légzés mellett orrmaszkon át $N_2O:O_2$ 70 %:30 % gázelegyében belélegeztetett 1,5-2 % izofluránnal altattuk. Testhőmérsékletüket rektális hőmérővel monitoroztuk, és visszacsatolásos elven szabályozott melegítőpárnával 37,1 és 37,4 °C között tartottuk (Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.). A műtéti beavatkozás megkezdése előtt az állatokat atropinnal kezeltük (0,1 %, 0,05 ml, i.m.) a légzőszervi nyákképződés megelőzésére. A bal a. femoralisba polietilén katétert helyeztünk a MABP invazív, folyamatos monitorozására, és artériás vér-gáz minták vételére. Az altatás mélységét számítógép képernyőjén folyamatosan megjelenített MABP és LFP regisztrátumok segítségével ellenőriztük. Végül az állatok fejét sztereotaxiás befogóba rögzítettük. Az állatok egy csoportjában pH-szenzitív mikroelektródát ültettünk az agykéregbe, a másik csoportot NR-alapú agykérgi képalkotáshoz készítettük elő.

A pH-szenzitív mikroelektróda beültetéséhez a jobboldali parietális koponyaacsonton fogorvosi fúró segítségével (Technobox 810, Bien-Air Dental S.A., Bienne, Svájc) két, egymástól 5 mm távolságban lévő kraniotómiát hoztuk létre (**4.3.1. ábra, A panel**). A kemény agyhártyát mindkét koponyaablakban óvatosan megnyitottuk, majd a feltárt agykérgi felszíneket aCSF-el folyamatosan nedvesen tartottuk. A pH-szenzitív üvegkapilláris elektródákat Voipio és Kalila⁴⁰² szerint készítettük el, majd a *rostralis* kraniotómián keresztül mikromanipulátor segítségével ültettük be az agykéregbe. A pH-szenzitív mikroelektróda közvetlen szomszédságába egy fiziológiás sóoldattal feltöltött üvegkapilláris referencia-elektrodát helyeztünk ($d=20\ \mu\text{m}$) a DC potenciál regisztrálására (**4.3.1. ábra, A panel**). Az elektródák közös referenciájaként és földelésként az állatok nyakbőre alá beültetett Ag/AgCl elektróda szolgált. A mikroelektródákat Ag/AgCl szálakkal kétcsatornás, magas bemeneti impedanciájú elektrométerhez csatlakoztattuk

(AD549LH, Analog Devices, Norwood, MA, U.S.A.). A H^+ szöveti ionkoncentrációjának megfeleltethető feszültség jelet négycsatornás analóg izolátoron keresztül (NL 820, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) úgy kaptuk meg, hogy a pH-szenzitív elektródával nyert jelből egy differenciál-erősítő révén (NL 834, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) kivontuk a referencia-elektrodával regisztrált feszültséget. A jelet további szűrés (NL 125, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) és kondicionálás (NL 530, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) után digitalizáltuk (analóg-digitális átalakító: MP 150, Biopac Systems, Inc., U.S.A.), és 1 kHz-es frekvenciával mintavételeztük. A kísérletek során a regisztrátumokat valós időben számítógép monitoron jelenítettük meg, és a későbbi elemzésekhez számítógépen tároltuk (szoftver: AcqKnowledge 4.2.0; Biopac Systems Inc., U.S.A.). Az extracelluláris szöveti pH értékeket további jelfeldolgozás révén a nyers, mV-os skáláról lineáris regresszióval, legkisebb négyzetes módszer alkalmazásával kaptuk meg.

A lokális CBF változásainak követésére az agyfelszín közelében a mikoelektrodák kérgi belépési pontjára irányított lézer-Doppler szondát helyeztünk el (Probe 403, PeriFlux 5000; Perimed AB, Svédország) (4.3.1. ábra, A panel). A lézer-Doppler jelet a pH regisztrátummal és a DC potenciállal együtt digitalizáltuk (MP 150, Biopac Systems, Inc., U.S.A.), az elektrofiziológiai regisztrátumokkal szinkron számítógép monitoron jelenítettük meg, és későbbi feldolgozásra tároltuk (AcqKnowledge 4.2.0, Biopac Systems, Inc. U.S.A.). Az elkészült preparátum köré Faraday-kalitkát helyeztünk.

A caudalis koponyaablakot a későbbiekben SD kiváltására használtuk úgy, hogy 1 M KCl-al átitatott, méretre vágott szűrőpapír darabot helyeztünk a feltárt agykérgi felszínre. A szűrőpapírdarabkát közvetlenül minden egyes SD sikeres kiváltása után eltávolítottuk, és a koponyaablakot aCSF-el gondosan átmostuk. Tíz perces alapszakasz felvétele után minden egyes preparátumon három SD-t váltottunk ki 15 perces időközönként.



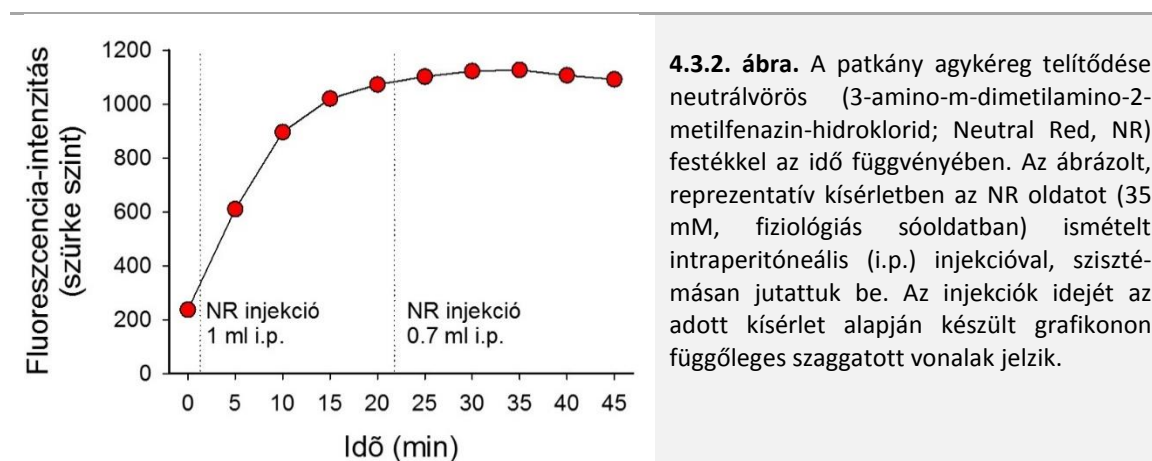
4.3.1. ábra. Az agykérgi pH kísérletes monitorozásához készített preparátumok. **A:** A szöveti pH mérése elektrofiziológiai elven. Két kis kraniotómiát alakítottunk ki a patkány jobb oldali parietális csontján (fekete körök). A caudalis pozícióból 1 M KCl-el kiváltott terjedő depolarizációkat (SD) a *rostralis* pozícióból regisztráltuk. **B:** A multi-modális képalkotáshoz készített preparátum. A parietális koponyacsonton zárt koponyaablakot hoztunk létre a neutrálvörös (NR) festékkel feltöltött agykéreg vizsgálatára (pirossal kitöltött fekete ellipszis). A koponyaablak medialis peremébe beépítettünk egy mikrodialízis pumpához csatlakoztatott üvegkapillárist, melyen keresztül 1 μ l 1 M KCl-el váltottunk ki SD-eket. A koponyaablak laterális pereme mentén egy intrakortikális üvegkapillárist ültettünk be az LFP és a DC potenciál regisztrálására. **C:** A multi-modális képalkotás (B) és az elektrofiziológiai módszer (A) kombinációja.

Az agykérgi pH változásainak NR-alapú, kép megjelenítéséhez a jobb parietális csonton zárt koponyaablakot alakítottunk ki (4.3.1. ábra, B panel). A koponyaablak elkészítése egyezett a korábban bemutatott módszerekkel (4.1. fejezet), annyi módosítással, hogy az ablak méretét csökkentettük. A teljes parietális csont eltávolítása helyett a koponyacsonton egy kb. $4,5 \times 4,5$ mm

területű trepanációt hoztunk létre. A koponyaablak medialis peremébe beépítettünk egy mikrodialízis pumpához (CMA/100, CMA/Microdialysis, Solna, Svédország) csatlakoztatott üvegkapillárist, melyen keresztül 1 μ l 1 M KCl beinjektálásával váltottunk ki SD-ket. Az SD-k kiváltása praktikus okok miatt annyiban tért el a fentebb bemutatott elektrofiziológiai mérőszorozattól, hogy a KCl a zárt koponyaablakban kihígult, míg nyílt koponyaablak esetén az KCl-lel átítatott papírvatta eltávolítását a kéri felszín gondos aCSF átmosása követte. A zárt koponyaablak lateralis szélé mentén beültettünk továbbá egy intrakortikális üvegkapilláris mikroelektrodát ($d=20 \mu\text{m}$), mely az SD-k kiváltásának helyével szemben, attól távol helyezkedett el az SD kialakulásának és terjedésének igazolására. A mikroelektroda és a nyak bőre alá beültetett Ag/AgCl referencia elektróda segítségével LFP-t és DC potenciált regisztráltunk.

Az elektrofiziológiai jeleket magas bemeneti impedanciájú előerősítőn keresztül átvezetve (NL 102G, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) differenciál-erősítővel (NL 106, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.), és a hozzá tartozó szűrőkkel és kondicionálókkal (NL 125, NL 530, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) regisztráltuk. A hálózati frekvencia-okozta zajt (50 Hz) analóg lyukszűrővel küszöböltük ki (HumBug, Quest Scientific Instruments Inc., Kanada). A jelet digitalizáltuk (analóg-digitális átalakító: MP 150, Biopac Systems, Inc., U.S.A.), és 1 Hz-es frekvenciával mintavételeztük. A regisztrátumokat valós időben számítógép monitoron jelenítettük meg, és a későbbi elemzésekhez számítógép merevlemezen tároltuk (szoftver: AcqKnowledge 4.2.0; Biopac Systems Inc., U.S.A.). Egy kísérlet esetén sikeresen kombináltuk a pH mérés két, eltérő módszerét, azaz a zárt koponyaablak preparátumba pH-szenzitív mikroelektrodát is ültettünk (**4.3.1. ábra, C panel**).

Végül a szövetet NR festékkel (Sigma-Aldrich) töltöttük fel, melyet 30-35 perccel az adatgyűjtés megkezdése előtt, $2 \times 1 \text{ ml}$ volumenben, 35 mM koncentrációban, fiziológiás sóoldatban oldva, i.p. adagoltunk az állatoknak.²¹⁷ Az agyszövet megközelítőleg 25-30 perc alatt telítődött a festékkel (**4.3.2. ábra**).



4.3.2. ábra. A patkány agykéreg telítődése neutrálvörös (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin-hidroklorid; Neutral Red, NR) festékkel az idő függvényében. Az ábrázolt, reprezentatív kísérletben az NR oldatot (35 mM, fiziológiás sóoldatban) ismételt intraperitoneális (i.p.) injekcióval, szisztémásan jutattuk be. Az injekciók idejét az adott kísérlet alapján készült grafikonon függőleges szaggatott vonalak jelzik.

Videó felvételek készítéséhez a fentebb bemutatott, laborunkban kialakított, multi-modális képalkotó rendszert használtuk (**4.2.2. fejezet**). Az eddigiekben bevezetett négy modalitás közül az RH-1838-at az NR-el helyettesítettük. A képalkotást a korábbiakhoz képest a következő módosításokkal hajtottuk végre. A kéregben felhalmozódott NR-t a sávszűrővel felszerelt, zöld LED-el gerjesztettük ($\lambda=540-550 \text{ nm}$) felvillanó üzemmódban, másodpercenként 100 ms hosszan. Az első, fluoreszcenciát rögzítő kamera estén a fény útjába az NR emissziós spektrumára optimalizált, 625 nm hullámhosszra centrált, 50 nm sávszélességű optikai sávszűrőt helyeztünk (XF3413-625QM50; Omega Optical Inc. Brattleboro, VT, U.S.A.). A zöld és piros IOS képsorokat az előzőekhez képest változatlanul rögzítettük. A felvett modalításokat háttérképek felvételével is

kiegészítettük úgy, hogy a két kamera az NR és a zöld IOS felvételeknél alkalmazott 100 ms-os ideig exponált a fényforrások felvillanása nélkül. A LASCA áramlási térképek készítéséhez új eszközöket állítottunk be. A 660 nm hullámhosszon világító lézer diódát (120 mW; HL6545MG, Thorlabs Inc., New Jersey, U.S.A.) a tápegység (LDT0520, Wavelength Electronics, Inc., Bozeman, U.S.A.) 160 mA áramerősséggel üzemeltette. A lézer dióda felvillanó módban másodpercenként 2 ms hosszan világította meg a preparátumot. Az áramlási térképek számításához egy a munkacsoportunk közleményt tekintettünk irányadónak.⁹⁴ Az eszközök összehangolt működését egy LabView környezetben írt, Windows háttéren futó program segítette.

Az optikai jelintenzitások változását a már bevezetett módszerrel értékeltük (4.2.1. fejezet). Az egymással párhuzamos képsorokra azonos pozícióban helyeztünk el ROI-kat (19 × 19 pixel; ~70 × 70 μm) az intenzitásértékek kiolvasására. Az NR fluoreszcens képsorokból nyert intenzitásgörbék feldolgozásánál fontos szempontnak tekintettük az RH-1838 esetén ismertett műtermékek kiküszöbölését. Az RH-1838 fluoreszcenciájának feldolgozásához képest az NR fluoreszcencia-intenzitásának helyes értékelése összetettebb feladatnak bizonyult, mert a hemoglobin fényelnyelése az NR gerjesztő tartományában (λ=540-550 nm) a legjelentősebb, és az NR emissziós hullámhosszán (λ=600-650 nm) is számottevő. Ezen körülmény következménye, hogy az SD-vel járó hemodinamikai válasz az NR SD-vel összefüggő fluoreszcencia-intenzitását jelentős mértékben, a hemodinamikai válasz kinetikája szerint, szöveti pH-tól függetlenül módosítja, gyengíti. Körültekintően kellett eljárunk a festék fakulásának korrekciójával is, mert az NR fluoreszcenciájának gyengülése az idő múlásával fokozódott. A nyers, optikai jeleket ezért olyan, korábban erre a célra bevezetett matematikai módszerek felhasználásával korrigáltuk, melyek a kísérleti modell mindezen tulajdonságait figyelembe vették.³⁶³

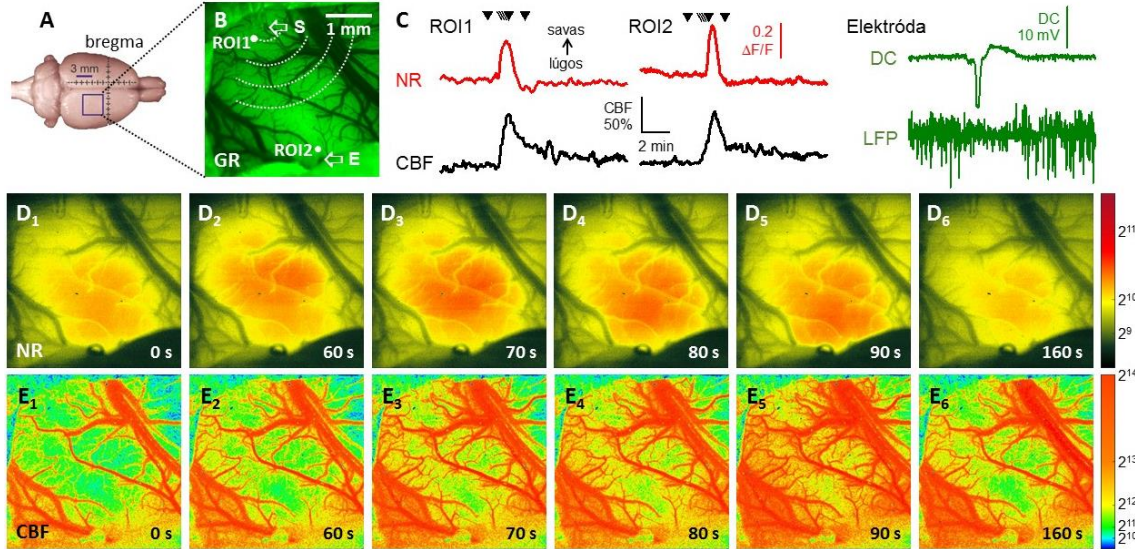
A részletes analízis során az első SD-t (SD1) és a később, ismételt kiváltott SD-eket (rSD) külön értékeltük. Ebben a fejezetben az SD-vel járó szöveti pH változások jellemzésére szorítkozunk; a hemodinamikai válaszokat fentebb részletesen elemeztük (4.1. és 4.2. fejezet), illetve a disszertáció későbbi fejezeteiben referenciaként tárgyaljuk (5.4. fejezet). A pH változások számszerűsítéséhez a domináns acidózis maximális amplitúdóját és a fél amplitúdónál mért időtartamát határoztuk meg. A kapott eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). Ahol relevánsnak adódott, az eredmények értékelését ismételt variancia-analízissel végeztük (p<0,05*), melyet páronkénti összehasonlítás követett.

Eredmények, és azok értelmezése

Az idegszöveti pH_i képi megjelenítése során minden egyes SD-vel az NR fluoreszcencia-intenzitásának megbízhatóan reprodukálható, tranzienst emelkedését figyeltük meg (e.g. rSD-re vonatkozó maximális kitérés: 0,234±0,10 ΔF/F; félamplitúdónál mért időtartam: 39,8±13,8 s), mely a kiváltás helyétől kiindulva haladt át a látótéren (4.3.3. ábra). Az optikai jelintenzitás emelkedése kétségtelenül az SD-hez társuló jelenség volt, mert az SD szinkron kialakulását igazolta az elektródával elvezetett DC potenciál SD-re jellemző, tranzienst, negatív kitérése, és az LFP ezzel együttjáró depressziója. Az NR fluoreszcencia-intenzitásának erősödésével jelzett intracelluláris acidózis továbbá térben és időben együtt jelentkezett az SD-hez csatolt, LASCA-val rögzített hiperémiával (4.3.3. ábra).

Az NR fluoreszcencia a neuronok és gliasejtek összesített pH_i tranzienst mutatta, ha elfogadjuk, hogy mindkét sejttípus azonos affinitással veszi fel a festéket, és hogy az optikai jelhez a kérgi érhálózatban keringő NR hozzájárulása elhanyagolható.²¹⁷ Az ép keringésű agykéregben az asztrociták pH_i-ja megközelítőleg 0,28 egységnyi tolódik el alkalotikus irányba az SD során.⁶⁰ Ugyanakkor a neuronok SD-vel összefüggő pH_i változásáról sokkal kevesebbet tudunk. Egy a közelmúltban végzett tanulmány a neuronok intracelluláris acidózisára szolgáltatott bizonyítékot

az SD alatt úgy, hogy neokortikális agyszeletekben szelektíven az idegsejteket töltötték fel fluoreszcens, pH-szenzitív festékkel (BCECF).⁴²⁵ Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy az SD során az NR fluoreszcenciával megjelenített pH_i döntő mértékben a neuronok acidózisát tükrözi, mely felülírja az optikai jelben az asztrociták alkalózisát.



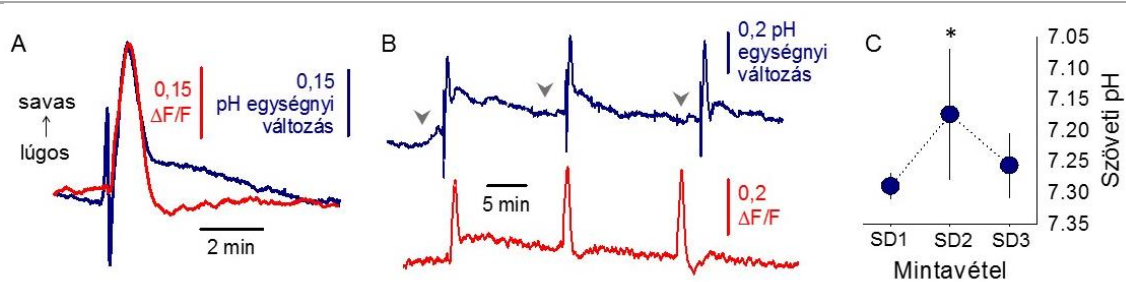
4.3.3. ábra. A nyers (i.e. a hemoglobin fényelnyelésére nem korrigált) neutrálvörös (Neutral Red, NR) és lokális agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) képsorok, azok meghatározott pontjaiból (region of interest, ROI) nyert intenzitásgörbék, és a beültetett elektródával elvezetett elektrofiziológiai változók (DC potenciál és mezőpotenciál – LFP) egy terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) áthaladását szemléltetik a látótéren. **A:** A zárt koponyaablak elhelyezkedése a parietális kéreg felett. **B:** A feltárt agykérgi felszín zöld megvilágításánál ($\lambda=540-550$ nm). Az SD kiváltásának helyéhez közel (ROI1) és attól távol (ROI2) olvastuk ki a C paneleken megjelenített intenzitásváltozásokat. A nyilak az SD kiváltását szolgáló üvegkapilláris hegyét (S) és az elektrofiziológiai változók elvezetése céljából beültetett mikroelektródát (E) jelölik. **C:** Az idősorok az NR fluoreszcencia-intenzitásának (piros) és a CBF (fekete) SD-vel összefüggő változásait mutatják. Az SD kialakulását a DC potenciál tranziens, negatív kitérése, és az LFP átmeneti depressziója igazolta (zöld). Az NR intenzitásgörbék felett sorban lefelé mutató fekete háromszögek a D és E paneleken látható felvételpárok időbeli mintavételi helyét jelölik. **D:** A reprezentatív felvételeken az SD-hez társuló szöveti acidózist az NR fluoreszcencia-intenzitásának emelkedése (melegebb színárnyalat) jelöli. **E:** A lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA) számított áramlási térképek az SD-hez társuló CBF változást jelenítik meg. A sorozat képein a melegebb színek a magasabb áramlási viszonyoknak felelnek meg. A monokróm kamerák által készített 16 bites fekete-fehér felvételeket a D és E sorozaton szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. A képsoroktól jobbra feltüntetett színskálák a színezéshez felhasznált szürke sávartományt jelölik.

Párhuzamos kísérleteinkben, pH-szenzitív mikroelektródát alkalmaztunk, és az SD-vel járó pH_e változásnak három, egymást követő fázisát azonosítottuk. Egy kezdeti, rövid acidózist egy gyors, szintén rövid ideig tartó alkalotikus kitérés követett, végül egy domináns, hosszabban elhúzódó, tranziens acidózis alakult ki (**4.3.4. ábra, A panel**). A kezdeti acidózis majdnem teljes bizonyossággal mérési artefaktumnak tekinthető. A műtermék abból adódott, hogy a pH-szenzitív mikroelektródával direkt mért feszültségváltozásból kivontuk a referencia-elektrodával regisztrált feszültség jelet, hogy a kettő különbségéből adódóan valós pH változásokat jeleníthessünk meg. Mivel a két elektróda hegyét a legprecízebb mikromanipulátorral sem lehet tökéletesen egy pontba helyezni, az elektródák hegyének térbeli eltérése eredményezi a kivonás révén a kezdeti savas irányú kitérést.²⁶⁶ Az SD-hez társuló pH válasz második, alkalotikus eleme a sejtekből az extracelluláris térbe áramló bikarbonátnak, illetve a szöveti laktát koncentráció rövid

csökkenésének tulajdonítható.^{132,209,267} Végül az SD-vel járó domináns acidózist döntően a szöveti laktát jelentős mértékű felszaporodása eredményezhette.³³²

Az első SD-vel (SD1) a szöveti acidózis maximális kitérése $0,38 \pm 0,09$ pH egységnyinek bizonyult, így a kiindulási $7,31 \pm 0,04$ pH értékről átmenetileg $6,93 \pm 0,09$ -ra csökkent a szövet kémhatása. Az acidózisból nagyon lassú visszatérést tapasztaltunk – még a 15 perccel később kiváltott SD2 előtt sem rendeződött a szövet kémhatása a kiindulási alap értékre (pH $7,17 \pm 0,11$ vs. $7,31 \pm 0,04$), ami egyezik a felszaporodott laktát viszonylag lassú újrahasznosulásával, vagy késleltetett eltávolításával a véráram révén.^{132,332} A szöveti pH fokozatosan, az SD3 kiváltását megelőzően közelítette meg ismét az SD1 kiváltása előtti kiindulási értéket (pH $7,26 \pm 0,05$) (**4.3.3. ábra, B-C panel**). Érdekes egyezés az SD-hez társuló szöveti pH változás és a CBF változás között, hogy több, egymást követő SD kiváltása esetén jellemzően csak az SD1 után figyelhető meg elhúzódó, enyhe szöveti acidózis és a hiperémiát követő oligémia is (Izd. 4.1.2. fejezet). A későbbi rSD-k esetén (SD2 és SD3) átlagban $7,26 \pm 0,09$ -ról, az acidózis maximumánál mért $0,33 \pm 0,10$ pH egységgel, $6,93 \pm 0,16$ -ra csökkent a szöveti pH. Számszerű mérési adataink teljes összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel.^{267,350}

Az NR fluoreszcencia-intenzitás SD-vel összefüggő emelkedését az elektródával regisztrált szöveti pH változás végső elemeként azonosított markáns acidózisnak feleltettük meg (**4.3.4. ábra, A-B panel**). Az egyezést szemléletesen támasztja alá, hogy az acidózis félamplitúdónál mért időtartama a két módszerrel kapott pH idősorokon szinte egyezőnek adódott (rSD eseményekre nézve: $39,8 \pm 13,8$ vs. $40,2 \pm 8,1$ s; NR alapú képkalkotás vs. pH-szenzitív mikroelektróda). Ez a megfigyelés azt is sejteti, hogy az SD során az NR fluoreszcenciával jelzett és pH-szenzitív mikroelektródával mért intra- és extracelluláris acidózis nagyon hasonló dinamikát mutat. Megfigyelésünket alátámasztja, hogy a sejtekben újonnan képződő laktát laktát-proton kotranszport útján gyorsan ürül az interstícium felé,⁴⁰⁵ és hogy a pH_i és pH_e egymással párhuzamosan csökken a szöveti laktát koncentráció emelkedésének függvényében agyi ischemia során.¹⁹⁸



4.3.4. ábra. A neutrálvörös (Neutral Red, NR) fluoreszcencia-intenzitásának emelkedése és az elektródával regisztrált szöveti pH változás összehasonlítása terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) során. **A:** A pH-szenzitív elektródával nyert jel (kék) és az NR fluoreszcencia (piros) kinetikája a sorozatban kiváltott második SD-re nézve (SD2). A savas irányú kitérést felfelé ábrázoltuk. Mindkét idősor (i.e. kék és piros) külön kísérletekből származó SD-k átlagát szemlélteti (n=6, mindkét vonaldiagramra nézve). **B:** Reprezentatív pH-szenzitív mikroelektródával regisztrált (kék) és NR fluoreszcencia (piros) idősorok a szöveti pH alakulását ábrázolják az SD-k során, valamint az SD-k közötti intervallumokban. Mindkét módszerrel kimutatható, hogy az első SD-t követően (SD1) a szöveti pH elhúzódóan enyhén savas marad az SD-k kiváltását megelőző alaphoz képest. A szöveti pH-t a szürke nyílhegyekkel jelölt időpontokban a C panelen számszerűsítve ábrázoltuk. **C:** Szöveti pH értékek az SD-k közötti intervallumokban, a B panelen nyílhegyekkel jelzett időpontokra nézve. Az adatokat átlag \pm stdev formában ábrázoltuk (n=6). Az adatok értékelését ismételt variancia-analízissel végeztük (F=5,724; p<0,05*); a páronkénti összehasonlítás eredményét a grafikonon jelöltük (p<0,05* vs. SD1).

A jelek eltérő forrása (intra- vs. extracelluláris) magyarázhatja továbbá azt, hogy az NR fluoreszcencia az elektródával mért kezdeti alkalotikus kitérést nem jelezte (4.3.4. ábra, A-B panel). Ha a kezdeti, extracelluláris, tranziens alkalózist részben a sejtekből kiáramló bikarbonát okozza,^{209,267} akkor az intracelluláris pH ellentétes irányba kell, hogy kitérjen.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Összefoglalva, eredményeink alapján elmondható, hogy a szöveti pH NR alapú képi megjelenítését sikeresen valósítottuk meg az SD-vel járó acidózis nyomon követésére. Kísérleteink továbbá egyedülállóak abban a tekintetben, hogy pH-szenzitív mikroelektródával is hitelesítettük képalkotó eljárásunkat, melyet minden korábbi, NR fluoreszcenciát kihasználó vizsgálat nélkülözött. A módszer integrálása a laboratóriumunkban létrehozott multi-modális képalkotó rendszerbe továbbá egyedi lehetőséget biztosít az agykérgi pH- és a hemodinamikai változások szinkron, térbeli és időbeli monitorozására. A kidolgozott eljárás további kutatásaink során jól alkalmazhatónak bizonyult például arra, hogy iszkémia során az agykérgi pH változásait összefüggésbe hozzuk az agyi keringési válaszokkal (5.4. és 6.2. fejezet), illetve hogy feltárjuk az SD-vel kapcsolatos szöveti acidózisra vonatkozó életkori sajátosságokat (7.4. fejezet).

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, M.Tóth O, Szepes BÉ, Tóth R, Ivánkovits-Kiss O, Obrenovitch TP, Bari F, **Farkas E**. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep*. 2017;7(1):1154.

5. Az iszkémiás agykéregben kialakuló agykérgi terjedő depolarizáció és a csatolt keringési és metabolikus változások jellegzetességei, kórélettani jelentősége

5.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció térbeli mintázata iszkémiás agykéregben: permanens, fokális előagyi iszkémia

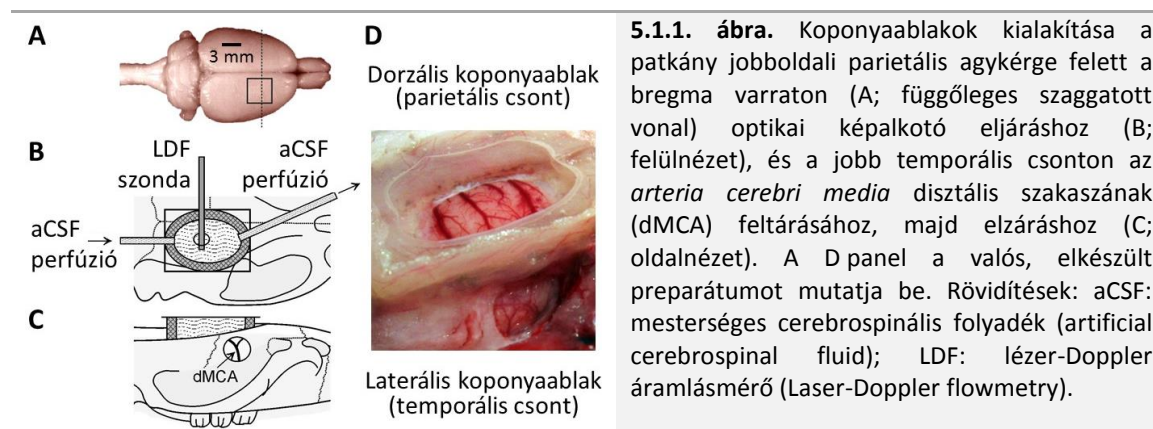
Háttér

Munkánk kezdetén laborunkban beállítottunk egy feszültségfüggő festéket alkalmazó képalkotó rendszert a KCl-al kiváltott SD-k megjelenítésére a sértetlen patkány agykéregben (4.1. fejezet). Miután meggyőződünk a módszer hitelességéről és megbízhatóságáról, az eljárást a permanens, fokális előagyi iszkémia patkány modelljében alkalmaztuk spontán kialakuló SD események vizsgálatára. A klasszikus, intraluminális filamentummal létrehozott *arteria cerebri media* elzárás (middle cerebral artery occlusion, MCAO) helyett az MCA disztális szakaszán (dMCA) végeztük az érelzárást, melyet a tempoláris koponyacsont megnyitásával tártunk fel (dMCAO). A preparátum előnye az MCAO-hoz képest, hogy a képalkotás céljára hozzáférhető agykéregben idéz elő iszkémiát a striátum érintettsége nélkül, és a képalkotáshoz sztereotaxiás befogóban rögzített állaton is létre lehet hozni, mégpedig úgy, hogy közben a kérgi látótér szinte megszakítás nélkül, folyamatosan tanulmányozható.

Kísérletsorozatunk konkrét célja az volt, hogy megállapítsuk a fokális iszkémia akut szakaszában spontán jelentkező SD-k kialakulásának helyét, tulajdonságait (pl. tranziens vagy permanens), időbeli és térbeli mintázatát. A módszer korlátait figyelembe véve arra kívántunk következtetni, hogy az SD milyen módon és mértékben járul hozzá az iszkémiás lézió fejlődéséhez, éréséhez.

Módszerek

Felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokat (260-380 g; Harlan UK Ltd., Bicester, U.K.; n=10) 1,5-2,0 % halotánnal altattunk N₂O:O₂ gázkeverék 2:1 arányú elegyében belélegeztetve, majd a fentebb ismertetett módon (4.1.2. fejezet) zárt koponyaablakot alakítottunk ki a jobb parietális kéreg felett a következő módosításokkal. Az SD kísérletes kiváltására szolgáló üvegapillás beültetését elhagytuk, mert az iszkémia során spontán kialakuló SD-ket vizsgáltunk. A koponyaablakot az agykéreg felett frontális irányba előrébb helyeztük a bregma varratra, hogy az MCA ellátási területét monitorozhassuk (5.1.1. ábra). A jobb temporális koponyacsontot a *musculus temporalis*-t leválasztottuk és elhúztuk, majd a dMCA felett a csonton fogorvosi fúrót használva (Technobox 810, Bien-Air Dental S.A., Bienne, Svájc) egy második, laterális kraniotómiát hoztunk létre, melyben a keményagyhártyát is eltávolítottuk (5.1.1. ábra). A későbbiekben az így feltárt dMCA elektrokoagulációjával indukáltunk permanens fokális előagyi iszkiémiát. Négy kísérlet esetén a CBF lokális változásainak követésére lézer-Doppler szondát (Probe 411, PeriFlux 5000; Perimed UK Ltd., Bury St Edmunds, U.K.) építettünk a parietális koponyaablakba (4.1.2. fejezet) a dMCA ellátási területe fölé, hogy igazoljuk az iszkémia kialakulását, és megbecsüljük annak mértékét. Végül az SD-re jellemző mezőpotenciál-változásokat a már részletesen bemutatott optikai képalkotó eljárással jelenítettük meg, amely a DC potenciállal analóg jelet adó RH-1838 feszültségfüggő festék fluoreszcenciáját használja ki (4.1.2. fejezet). Képsoronként számos ROI-t helyeztünk el olyan pozíciókban, hogy a megjelenő SD-k fókuszához közel és azoktól távol is kiolvashassuk az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitásváltozát. A kapott intenzitásgörbéket az RH-1838 fakulásának korrekciója után analizáltuk (4.1.2. fejezet). A kapott eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízist SPSS szoftverrel végeztük (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.); az értékeléshez ismételt variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$), melyet páronkénti összehasonlítás követett ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

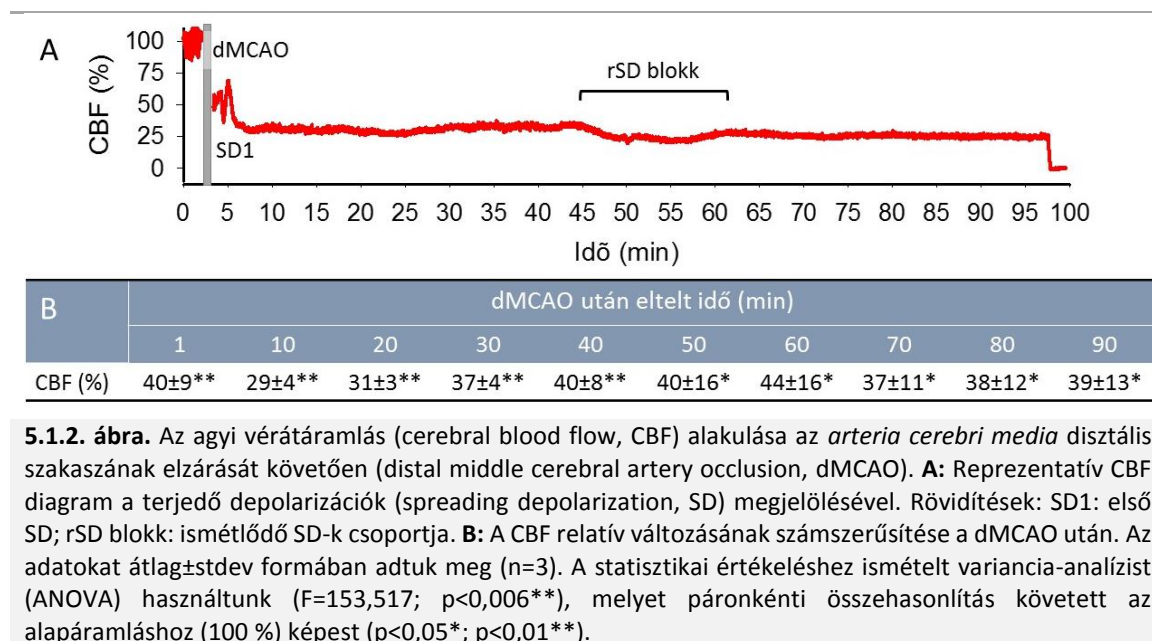


Az agyi perfúzió jellegzetességei

A lézer-Doppleres áramlásmérés eredménye megmutatta, hogy a dMCA kérgi ellátási területén az artéria elzárását (dMCAO) követően a CBF hozzávetőlegesen 25-47 % között mozgott a kiindulási alapáramláshoz képest (5.1.2. ábra). A jelentős szórást az eredményezhette, hogy a dMCA elágazási mintázata a Sprague-Dawley patkány törzsben az állatok között jelentős anatómiai változatosságot mutat.¹³⁵ Hozzájárulhatott a mérési eredmények szórásához az is, hogy a lézer-Doppler szondát állatonként valamelyest eltérő pozícióban, az adott lefutású piális érhálózatot elkerülve helyeztük el. A dMCAO-t követő, stabilan alacsony CBF igazolta tehát, hogy a képalkotáshoz kialakított látótéren permanens iszkiémiás állapot jött létre. Az áramlási értékek

végül arra engedtek következtetni, hogy jó megközelítéssel a fokális iszkémiás góc penumbra régióját tanulmányoztuk, melyre leginkább a 20-40 %-os CBF tartomány jellemző.¹⁰

Az SD-hez csatolt CBF változás érdekes módon csak az első SD (SD1) esetén rajzolódott ki jól láthatóan (5.1.2. ábra). A CBF válaszreakció kinetikája a sorozatban ismétlődő események közül tipikusan első SD-re jellemzően alakult,¹⁶ azaz a kezdeti áramlásesést markáns hiperémia, majd hosszan elhúzódó oligémia követte (Izd. 4.1.2. fejezet). A dMCAO után később ismétlődő SD eseményekhez (recurrent spreading depolarization, rSD) nem társult értékelhető CBF változás (5.1.2. ábra), hasonlóan egy előző közleményben leírtakhoz.²⁰ A CBF változás elmaradásának oka lehet, hogy az iszkémia előidézésekor a vazodilatátor adenzin termelődése fokozódik, és az ATP szint csökkenése is értágító a vaszkuláris simaizomsejtek K_{ATP} csatornáinak nyitása révén.⁶⁵ Valószínű, hogy így az rSD-k megjelenésekor a dMCA ellátási területén az arteriolák már maximálisan kitágultak, ami nem tette lehetővé az SD-hez csatolt hiperémia további létrejöttét.



5.1.2. ábra. Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) alakulása az *arteria cerebri media* disztális szakaszának elzárását követően (distal middle cerebral artery occlusion, dMCAO). **A:** Reprezentatív CBF diagram a terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD) megjelölésével. Rövidítések: SD1: első SD; rSD blokk: ismétlődő SD-k csoportja. **B:** A CBF relatív változásának számszerűsítése a dMCAO után. Az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg (n=3). A statisztikai értékeléshez ismételt variancia-analízist (ANOVA) használtunk (F=153,517; p<0,006**), melyet páronkénti összehasonlítás követett az alapáramláshoz (100 %) képest (p<0,05*; p<0,01**).

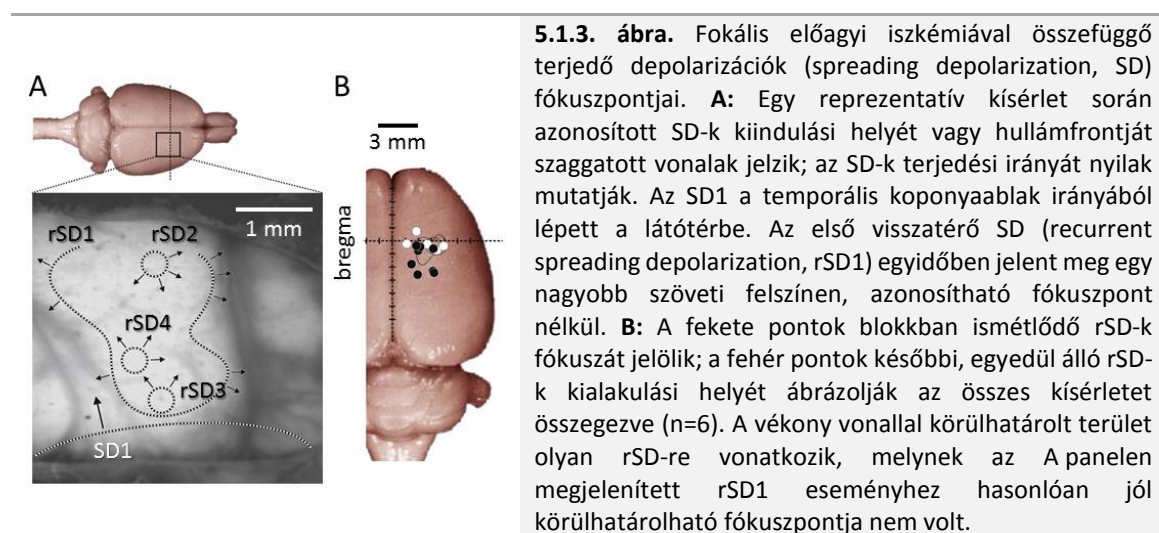
A terjedő depolarizációk mintázata

Az SD1 a dMCAO után rövidesen, átlagban 3,3±0,4 perccel terjedt a látótérbe a koponyaablak laterális pereme felől (5.1.3. ábra, A panel). Az esemény valószínűleg nem az iszkémiával összefüggésben, hanem a dMCAO-t kialakító műtéti beavatkozás eredményeként (i.e. a kéreg mechanikai érintése révén) alakult ki. Ezt a feltevést támasztja alá egyrészt az, hogy az SD1 a temporális koponyaablak felől érkezett a látótérbe. Másrészt, ha figyelembe vesszük a dMCAO és az SD1 észlelése között eltelt időt (3,3±0,4 min), valamint az SD1 átlagos terjedési sebességét (4,2±0,5 mm/min), az SD1 fókusza szintén megfeleltethető volt térben és időben a dMCA elektrokoagulációjával. Ezért érdeklődésünk középpontjába a dMCAO után később megjelenő, az iszkémiával összefüggő rSD események kerültek.

Az rSD-k döntő többsége pontoszerű fókuszból, radiálisan szétterjedve jelent meg a látótérben (5.1.4. ábra). Ritka esetben az rSD a kéreg egy nagyobb területén egyidejűleg jött létre, jól körülhatárolt fókusználkül (lásd: rSD1 az 5.1.3. ábra A panelén). Nedergaard és Hansen²⁷³ valószínűleg ugyennyel a jelenséget figyelte meg fokális iszkémiában, amikor egymástól 1-7 mm távolságra beültetett intrakorikális mikroelektrodákkal az SD-re jellemző negatív DC potenciál kitérését több pontból egyidőben vezette el.²⁷³

Az első rSD a dMCAO után $58,1 \pm 8,9$ perccel alakult ki. Az időbeliség megfelel az SD-k mintázatának a klasszikus, intraluminális filamentummal létrehozott MCAO modellben,^{168,280,417} bár az eddigi, elektrofiziológiai megközelítésen alapuló tanulmányok az SD fókuszát nem tudták azonosítani. Az első rSD-t gyakran közel azonos pontból kiindulva, 1,5-4 perces időközönként rögtön további 2-3 rSD követett. A rSD-k gyors egymás utáni mintázata egy jól meghatározható rSD blokkot alkotott (5.1.5. ábra), mely emlékeztet az SD-k csoportos időbeli mintázatára SAH-on átesett betegekben.²⁹ Végül az rSD blokkhoz viszonyítva 20-26 perccel később ($78,4 \pm 2,9$ perccel a dMCAO után) újabb, egymástól független rSD eseményeket azonosítottunk (pl. rSD3-4 az 5.1.5. ábrán). A kései rSD-k eltértek az rSD blokk eseményeitől abban a tekintetben is, hogy kivétel nélkül pontszerű fókuszról indultak ki, az rSD blokk eredetétől távol (1,5-2 mm).

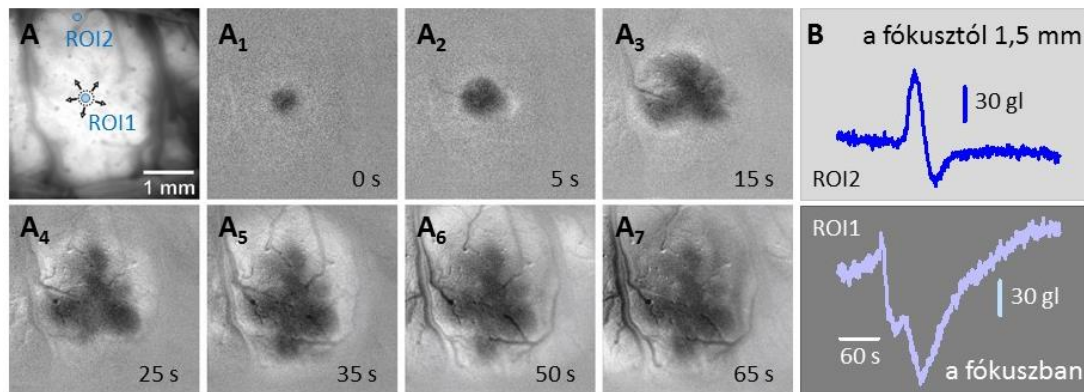
Az rSD-k fókusza a bregmától *anterior* 1,5 mm és *posterior* 3 mm közé, illetve a *fissura longitudinalis*-tól laterálisan 1-5 mm közötti távolságra esett. A kései rSD-k az rSD blokkhoz képest jellemzően *anterior* irányban alakultak ki (5.1.3. ábra B panel). Az rSD-k fókuszanak topográfiája jó egyezést mutatott egy korábbi közlemény eredményeivel, ahol a parietális kéregben a fokális iszkémia során jelentkező SD-eket IOS képalkotással figyelték meg.⁵⁴



5.1.3. ábra. Fokális előagyi iszkémiával összefüggő terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD) fókuszpontjai. **A:** Egy reprezentatív kísérlet során azonosított SD-k kiindulási helyét vagy hullámfrontját szaggatott vonalak jelzik; az SD-k terjedési irányát nyilak mutatják. Az SD1 a temporális koponyaablak irányából lépett a látótérbe. Az első visszatérő SD (recurrent spreading depolarization, rSD1) egy időben jelent meg egy nagyobb szöveti felszínen, azonosítható fókuszpont nélkül. **B:** A fekete pontok blokkban ismétlődő rSD-k fókuszeit jelölik; a fehér pontok későbbi, egyedül álló rSD-k kialakulási helyét ábrázolják az összes kísérlet összegezésében (n=6). A vékony vonallal körülhatárolt terület olyan rSD-re vonatkozik, melynek az A panelen megjelenített rSD1 eseményhez hasonlóan jól körülhatárolható fókuszpontja nem volt.

A feszültségfüggő festékekkel végzett első kísérleteink szerint az SD-t az intakt keringésű kéregben az RH-1838 fluoreszcenciájának erősödése kísérte (4.1.2. fejezet) (4.1.5. ábra). A hiperpolarizáció alatt az optikai jel intenzitása a kiindulási érték alá csökkent, ami annak tulajdonítható, hogy az ekkor maximumát elérő, SD-vel járó hiperémia erősebben nyeli el a festéket gerjesztő és emittált fényt (4.2.1. fejezet) (4.2.3. ábra). A hirtelen szívmeállítás után megjelenő SD vizsgálata során azt is megállapítottuk, hogy a hemoglobin deszaturációja is gyengíti az RH-1838 jelintenzitását (4.2.2. fejezet) (4.2.7. ábra). A dMCAO modellünkben az rSD-k fókuszanál egy sötét foltot (fluoreszcencia gyengülése) keskeny, világos gyűrű vett körül (fluoreszcencia fokozódása), majd az SD terjedésével a fókusztól távolodva a világos sáv kiszélesedett. Az RH-1838 fluoreszcenciájának rSD-t jelző változása a fókuszból és attól távolabb jól láthatóan eltért (5.1.4. ábra). Az intenzitásváltozások értékelése megmutatta, hogy az rSD fókuszában a fluoreszcencia hirtelen, rövid idejű, kismértékű intenzitás-fokozódását domináns, tranziens gyengülés követte, míg a terjedő rSD-t döntően az optikai jel tipikus fokozódása jellemezte (5.1.4. ábra). Az rSD fókuszában az optikai jel gyengüléséért az SD-vel járó hiperémia mint fényelnyelő jelenség nem lehetett felelős, hiszen az rSD-eseményekhez nem társult áramlásemelkedés (5.1.2. ábra). Ezért azt feltételezzük, hogy az rSD megjelenésével együtt a lokális mikroérhálózatban a hemoglobin számottevő deszaturációja játszódott le, és ezt tükrözte az

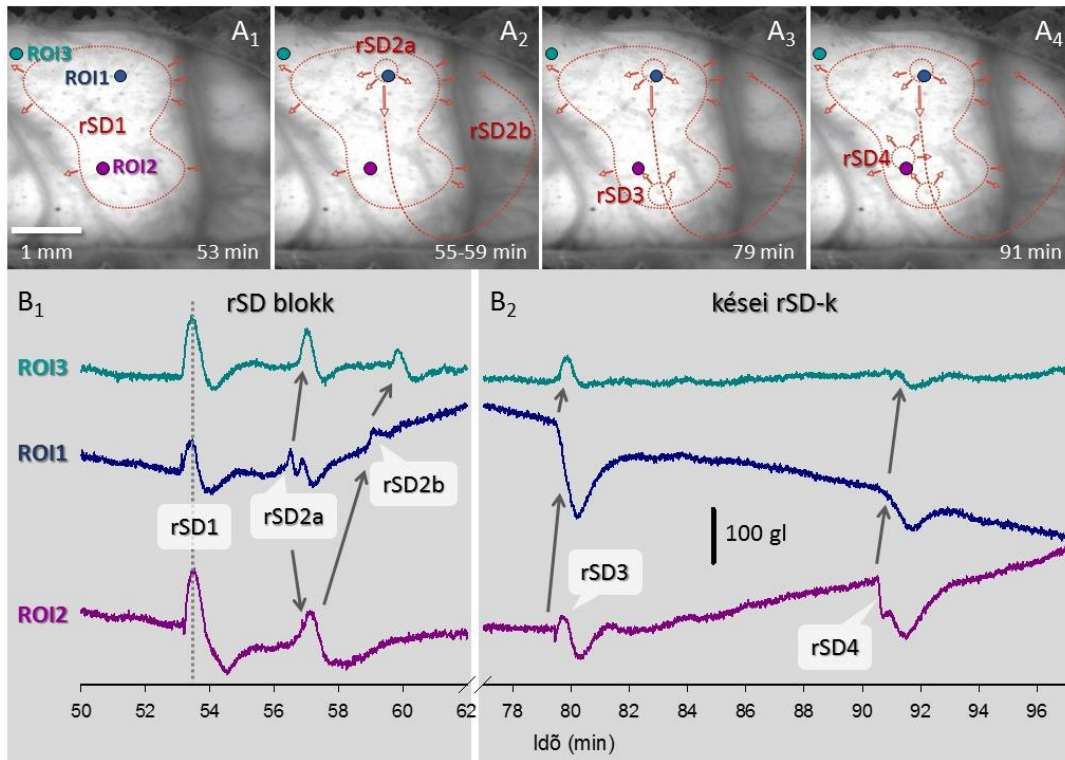
RH-1838 jelintenzitásának csökkenése. Elképzelésünk összhangban áll azzal a NADH fluoreszcenciáján alapuló megfigyeléssel, hogy az intakt kéregben terjedő SD során a szövet oxigén felhasználása megduplázódik,²⁵³ illetve a kapillárisok közvetlen szomszédságában hipoxiás gócok is kialakulhatnak.³⁷² Az intakt szövetben az SD-hez csatolt hiperémia mértéke meghaladja a szövet által támasztott metabolikus igényt („luxury perfusion”), és a hemoglobin szaturációja az SD alatt nem mutat csökkenést.^{113,253} Iszkémiás állapotokban azonban az SD-t követő CBF válaszreakció elégtelen,^{96,344} a szövet oxigénfelhasználása meghaladja a kínálatot, és a hemoglobin deszaturációja jelentős.³⁰³ Mindezek alapján megállapítható, hogy az rSD fókuszában tapasztalt jelintenzitás-csökkenés súlyos metabolikus krízis indikátora lehet.



5.1.4. ábra. Reprezentatív képsorok (A) és a feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának változása (B) egy visszatérő terjedő depolarizáció (recurrent spreading depolarization, rSD) kialakulásával, az *arteria cerebri media* disztális szakaszának elzárása (dMCAO) után 60 perccel. **A:** Az RH-1838-al feltöltött kérgi felszínen a reprezentatív rSD fókuszát szaggatott körvonal, az rSD terjedésének irányát nyilak jelölik. Az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitását két, egymástól 1,8 mm távolságban elhelyezett érdeklődési területről (region of interest, ROI; kék pontok) olvastuk ki. A₁-A₇: Az rSD képi megjelenítése RH-1838 fluoreszcenciája alapján. A képsort háttérkivonással és a kontraszt optimalizálásával kaptuk. **B:** Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának változása az A paneleken megadott ROI1 (alsó diagram), és ROI2 (felső diagram) területén. A változások mértékének összehasonlítását segíti, hogy a két idősor skálázása megegyezik. Rövidítés: gl: szürkeszint (gray level).

Az optikai jel gyengülését azonban nem csak rSD-k fókuszában tapasztaltuk, hanem adott feltételek mellett terjedő eseményekkel is. Jellemzően olyan helyeken kísérte az rSD áthaladását az RH-1838 fluoreszcenciájának csökkenése, ahonnan korábban már rSD eredt (5.1.5. ábra: kései rSD-k a ROI1-en), vagy az adott eseményt megelőzően már számos rSD haladt át (5.1.5. ábra: rSD4 a ROI3-on). Ha tehát egy adott területen az rSD-k ismételten haladtak végig, nagyobb eséllyel kaptunk a hemoglobin deszaturációjára utaló optikai jelet. Ha elfogadjuk az előző bekezdésben tett megállapítást, hogy az RH-1838 jelintenzitásának csökkenése a súlyosbodó metabolikus krízis indikátora, akkor elmondható, hogy az rSD-k ismétlődése az iszkémia elmélyüléséhez járulhatott hozzá. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy az rSD-k keletkezési helye a kéreg azon területét jelölte ki, amelyet a dMCAO-révén kialakított iszkémia a legsúlyosabban érintett. Egyrészt iszkémiás agykéregben az SD ott alakul ki, ahol a perfúziós deficit egy meghatározott küszöböt meghalad,³⁷⁴ másrészt, ahogy eredményeink is tanúsítják, maguk az SD események súlyosbítják a szövet metabolikus krízisét, ezzel egy szövetkárosító öngerjesztő kört hoznak létre.^{96,164} Erre utalnak azok a klinikai adatok is, melyek a tranziens SD-k növekvő összesített időtartamát a neurológiai tünetek súlyosbodásával hozták összefüggésbe SAH-on átesett betegekben.¹⁰⁸ Feltételezzük tehát, hogy dMCAO modellünkben a primer kérgi iszkémiás infarktus a későbbiekben azon a területen alakulhat ki, ahol az rSD eseményeket észleltük. Elképzelésünket

azonban más megközelítéssel, például a sérülés mértékének szövettani vizsgálatával a továbbiakban igazolni kell.



5.1.5. ábra. Visszatérő terjedő depolarizációk (recurrent spreading depolarization, rSD) fókusza és terjedése (A₁₋₄), és a feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának változása (B₁₋₂) egy reprezentatív kísérletben az *arteria cerebri media* disztális szakaszának elzárása (dMCAO) után. A₁₋₄: Az RH-1838-al feltöltött kérgi felszínen az rSD-k kiindulási helyét piros szaggatott vonalak jelzik; az rSD-k terjedési irányát nyilak mutatják. A képek jobb alsó sarkában a dMCAO-tól eltelt időt adtuk meg. Az RH-1838 fluoreszcenciájának intenzitását három kijelölt érdeklődési területről (region of interest, ROI) olvastuk ki. A ROI-k pozícióját a következők szerint határoztuk meg: a ROI1-et az rSD blokk fókuszába, míg a ROI2-t a kései rSD-k fókuszához közel helyeztük el. A ROI3 az rSD-k terjedésének útjába, az rSD-k kiindulási pontjától távol került. A ROI-k színe megfelel a B₁₋₂ paneleken bemutatott diagramok színekódolásával. B₁₋₂: Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának változása az A paneleken megadott ROI-k területén a dMCAO-tól eltelt idő függvényében. Az rSD1 (A₁) mindhárom ROI-n egyszerre jelent meg (függőleges szaggatott vonal) igazolva, hogy a kéreg egy nagyobb területén egyidejűleg jött létre, pontszerű fókusz nélkül. Az rSD2 (A₂) a ROI1-től indult el (rSD2a), majd a ROI2 érintése után a látótérben visszakanyarodva (rSD2b) ismét ráterjedt a ROI1-re, majd tovább haladt a ROI3-ra. A kései rSD3 és rSD4 a ROI2 közelében keletkezett, és radiálisan terjedt tovább a ROI1-re, majd a ROI3-ra. A kései rSD-k az rSD blokk fókuszánál (ROI1) az RH-1838 jelintenzitásának csökkenését okozták. A terjedés irányát az idősorok között szürke nyilak illusztrálják.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Összefoglalva, kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a fokális iszkémia kialakulását követően egy órán belül megkezdődik az SD események ismételt megjelenése. A regisztrált rSD-k kezdetben blokkba csoportosulva, majd egyenként külön állva jöttek létre. Az rSD-k kivétel nélkül mind tranziens depolarizációk voltak, de ugyanazon a kérgi területen egymás után áthaladva feltételezhetően súlyosbították az érintett szöveti zóna metabolikus krízisét.

A munka elkészültekor úttörő jellegűnek számított, hiszen az első olyan tanulmány volt, amelyben agyi iszkémia állatmodelljében lehetőség nyílt az SD események folyamatos követésére, térben és időben egyaránt. A mezőpotenciál monitorozása lényeges előrelépésnek bizonyult az

SD-re adott hemodinamikai választ kihasználó képalkotó eljárásokhoz képest (pl. LASCA),^{112,357,358} hiszen a mezőpotenciál változásainak megjelenítése olyan SD-ket sem téveszt szem elől, amelyekhez értékelhető CBF változás nem társul (5.1.2. ábra).

Munkánk azzal is újat hozott, hogy az SD-k fókuszát meg tudtuk határozni, és egy adott esemény terjedésének jellegzetességei a látótér eltérő pontjaiban tetszőlegesen értékelhetővé váltak. A módszer adottsága, hogy az elkészült képsorokra az értékeléskor tetszőleges számú és pozíciójú ROI helyezhető fel az események térbeliségének ismeretében. Így például információ nyerhető arról, hogy különböző mértékben perfundált szöveti zónákon áthaladva miként módosulhat az SD terjedése.

Az itt bemutatott kísérleteink megalózták a multi-modális képalkotó rendszerünk kialakítását és hitelesítését (ld: 4.2. fejezet), így a szövet lokális áramlási viszonyairól az SD-vel összhangban nem tudunk egyértelmű eredménnyel szolgálni. Következő kísérleteink során azonban a multi-modális képalkotás adottságait és előnyeit kihasználva az iszkémiával kapcsolatos és az SD-hez társuló perfúziós változások térbeliségét is figyelembe vettük következtetéseink megfogalmazásához.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Farkas E, Obrenovitch TP. (2009) Direct, live imaging of stroke-associated cortical spreading depression in experimental models. In Recent advances and new strategies in stroke research, Editor: Erdő, F., Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 53-71., ISBN: 978-81-7895-385-4.

5.2. Az agykérgi terjedő deplarizációval járó hemodinamikai változások: permanens multifokális előagyi iszkémia

Háttér

Következő kísérletsorozatunk tervezésekor már rendelkezésünkre állt a kialakított multimodális képalkotó rendszerünk (4.2.2. fejezet). Az előzőkhez képest a legfontosabb előrelépés, hogy az iszkémia mértéke a látótér bármely pontjában értékelhetővé vált, és az SD-hez társuló hemodinamikai változásokat is nyomon követhettük. Kihasználtuk a módszer azon egyedi adottságát, hogy az agykérgi potenciálváltozások és a csatolt hemodinamikai események térben és időben megfeleltethetők egymásnak.

A mikropartikulumok infúziójával indukált multifokális előagyi iszkémia transzlációs szempontól lényeges és elfogadott patkány stroke modellnek számít, hiszen hűen reprodukálja a kisebb mikroembóliás agyi infarktuszokat, és a multi-infarktus demencia kórfolyamatait.^{255,263} A modell számunkra is ígéretesnek tűnt az SD-k fókuszának vizsgálatára, mert egérben a kísérletes mikroembolizáció ismétlődő SD-ket indukál.²⁸² Modellünk iszkémiás agysérülésekre vonatkozó érvényességét azonban igazolni kellett, mert a mikroembolizációval kiváltott SD-ket tanulmányozó egér kísérletben agyi infarktust nem figyeltek meg (Nozari et al., 2010).²⁸² Az iszkémiás károsodást ezért munkánk során szövettanilag is jellemeztük.

Kísérletsorozatunk meghatározott célja az volt, hogy az előző fejezet (5.1. fejezet) eredményeire építve az iszkémiás szövetben zajló SD események hemodinamikai következményeit azonosítsuk, az iszkémia mértékével és mintázatával összefüggésbe hozzuk, és mérlegeljük az SD-k kórellettani jelentőségét multifokális előagyi iszkémiában.

Módszerek

Kísérleteinket 1,5-2,0 % halotánnal (N₂O:O₂ 2:1) altatott, felnőtt, hím, Sprague-Dawley patkányokon végeztük (n=13). A jobb oldali *arteria femoralis*-ba kanült vezetünk a MABP folyamatos monitorozására és artériás vérgáz minták gyűjtésére. A jobb oldali *arteria carotis communis*-t (CCA) a nyak ventrális bőrén középvonalban ejtett metszés révén tártuk fel. A nyálmirigyek elhúzása után a *musculus sternohyoideus*-t és *sternomastoideus*-t szétválasztottuk, majd a CCA-t kiemeltük, és a *nervus vagus* artéria mentén futó ágait a CCA-ról óvatosan leválasztottuk. A CCA-n kis bemetszést ejtve polietilén kanült vezetünk az *arteria carotis interna*-ba a koponya alapjáig (1,0 mm OD x 30 cm Intravenous Cannula, Sims Portex, Smith Industries, Hythe, Kent, U.K.), majd a kanült rögzítettük. Bár az eljárás az agyi vérellátást az egyoldali CCA-n keresztül gátolja, a patkány Willis körének jól fejlett anasztomózis rendszere az áramláskiesést kielégítően kompenzálja. A kanül-okozta elzáródás az adatgyűjtés során SD-t önmagában nem indukált (Isd. kontroll állatok ismertetése alább). A nyak bőrének zárása után az állatok fejét sztereotaxiás befogóba rögzítettük, és a fentebb ismertetett módon (5.1. fejezet) zárt koponyaablakot alakítottunk ki a jobb parietális kéreg felett. A kéri felszínről a laborunkban fejlesztett multi-modális képalkotó rendszerrel 1 Hz-es mintavételezési frekvenciával készítettünk párhuzamos képsorokat a mezőpotenciál (RH-1838), a CBF (LASCA), a CBV (zöld IOS) és a hemoglobin deszaturációjának (piros IOS) dinamikájáról (4.2.2. fejezet).

Tíz perc alapvonal felvétele után a CCA kanülon mikropartikulumok infúziójával (d=45-53 µm; 2000 partikulum/0,6 ml 0,02 % Tween-20; 300 µl/min; UVPMS-BY2, Cospheric, Santa Barbara, CA, U.S.A.;) agyi mikroembólusokat hoztunk létre. Az embolizációt követően 60 percig regisztráltunk, majd a kísérleteket a halotán túladagolásával fejeztük be. A szívmegállás után még 10 percig rögzítettünk képeket.

A kísérleti modellben kialakuló iszkémiás sérülés igazolására szövettani vizsgálatokat végeztünk. További hét felnőtt, hím, Sprague-Dawley patkányt (340-430 g) 1,5-2 % izofluránnal altattunk N₂O:O₂ gázelegy 2:1 arányú keverékében, és a fent ismertetettek szerint előagyi multifokális iszkémiát indukáltunk. Az állatokat 24 órás túlélést követően mély altatásban dekaptáltuk, az agyukat gyorsan eltávolítottuk, majd jég hideg 0,1 M foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldatban (phosphate-buffered saline, PBS) öblítettük. Az agyukat patkány „brain matrix”-ba helyeztük, és a koronális síkban mikrotóm pengével 2 mm vastag előagyi szeleteket készítettünk. A szeleteket 2 % 2,3,5-trifeniltetrazólium-klorid (TTC) 0,1 M PBS oldatában, fénytől védve, szobahőn, 20 percig inkubáltuk, végül 4 % paraformaldehidben fixáltuk, és 4 °C-on tároltuk. A színreakció alapján (piros szín: ép szövet, színreakció elmaradása: infarktus) igazoltuk, hogy a modellben a hipoperfúzió mértéke kellően súlyos volt iszkémiás infarktusok kialakulásához, és megállapítottuk a szemmel látható infarktusok anatómiai helyzetét. Mivel a TTC festés a kiterjedtebb léziókat jelöli, és a mikroinfarktusok kimutatására nem alkalmas, a TTC-festett szeleteket paraffinba ágyaztuk, és további, 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A paraffinos metszeteket hematoxilín-eozinnel festettük, fénymikroszkóppal vizsgáltuk, és metszetszkennerrel digitalizáltuk (Zeiss Mirax Midi Slide Scanner, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Németország).

A kísérletek közül négy esetben nem azonosítottunk mikropartikulumokat a látótérben kirajzolódó piális érhálózatban, és SD-k sem jelentkeztek, így a műtéti beavatkozás kontrolljaként tekintettük őket. További 2 állatot kizártunk a későbbi értékelésből, mert a CCA kanül felvezetése során levegő buborékok kerültek az agyi érhálózatba, és az SD-k nagyon nagy frekvenciával haladtak át a látótéren, ami súlyos iszkémiára engedett következtetni. Ezek után hét kísérletet találtunk minden szempontból alkalmasnak az eredmények értékelésére.

Képsoronként számos ROI-t helyeztünk el olyan pozíciókban, hogy a megjelenő SD-k fókuszához közel és azoktól távol is kiolvashassuk az optikai jelek intenzitásváltozásait a kéri parenchymán. A kiválasztott ROI-kat a négy, egymással szinkron készült modalitáson azonos

pozícióban alkalmaztuk (RH-1838, CBF, CBV, hemoglobinszaturáció). Reprezentatív esetekben a piális arteriolák szegmenseire is helyeztünk ROI-kat a LASCA képsorokon úgy, hogy az ér lumenbe rekedt mikropartikulomtól proximálisan és disztálisan is értékelhető legyen az áramlás mértéke.

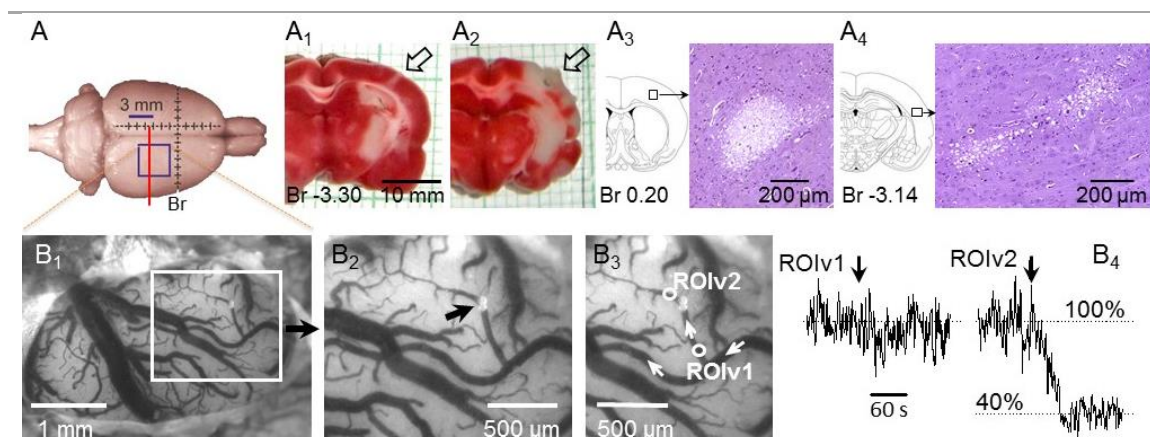
A CBF változásokat relatív formában fejeztük ki az iszkémia indukciója előtti alapot 100 %-nak, a szív megállást követő jelet 0 %-nak tekintve. A mikroembolizáció-okozta CBF változásokat teljes-kép analízissel is értékeltük. A látótér szélén a koponyacsontot és a kérgi felszínen kirajzolódó piális érhálózatot maszkkal kikapartuk. A megmaradó hasznos területen minden egyes pixelt a következő áramlási sávokba soroltunk: <40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100% és >100%. Az egyes áramlási sávokba jutó pixelek összesített területét relatív formában fejeztük ki a teljes hasznos területhez képest.

Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízist SPSS szoftverrel végeztük (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.); az értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$), melyet több csoport összehasonlítása esetén Fisher post hoc teszt követett ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

A multifokális előagyi iszkémia modell jellemzői

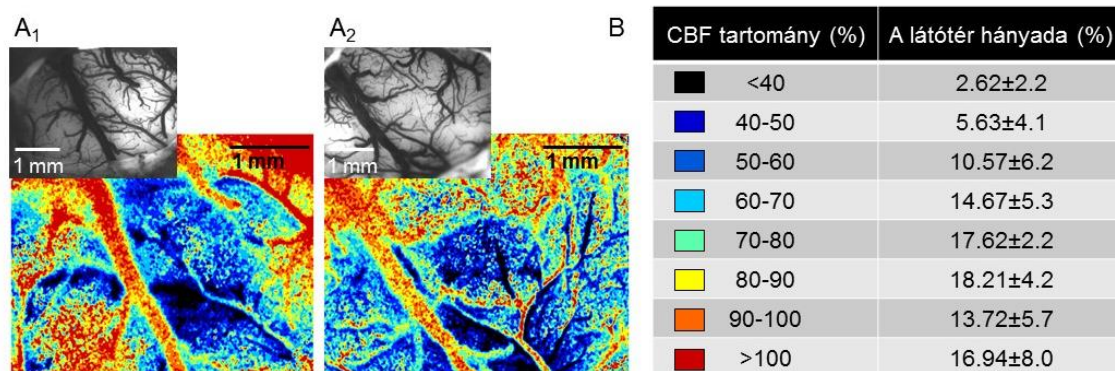
A preparátum élettani változói az iszkémia során a fiziológiás tartományban alakultak, bár a CO₂ parciális nyomása alacsonyabbnak mutatkozott (MABP: 100±11 Hgmm; vér pH: 7,50±0,04; pO₂: 151±15 Hgmm; pCO₂: 16,9±7,8 Hgmm). A mikropartikulumok infúziója után a zöld IOS képsorokon jól látszott a mikropartikulumok áthaladása és megrekedése az egyes piális arteriolák lumenében (5.2.1. ábra, B₁₋₂ panel). Egy adott mikropartikulum elakadásától disztális érszakaszban az áramlás határozottan csökkent, melyet a LASCA áramlási térképekből olvastunk ki (5.2.1. ábra, B₃₋₄ panel). Bár az elzáródott érben a vérátáramlás teljes megszűnését vártuk, a kapott érték mégis 40 % körül alakult (5.2.1. ábra, B₄ panel). A részlegesen fennmaradó perfúzió abból adódhatott, hogy az érelzáródás nem volt teljes, vagy az arteriolára helyezett ROI-ból nyert értékek az ér alatti parenchyma áramlásviszonyait is magukban foglalták, különösen az érelzáródás utáni állapotban.

Az embolizáció után a parenchymális CBF mintázata is hirtelen megváltozott. Az áramlási értékek területi eloszlása nagy változatosságot mutatott egy adott látótéren belül és az egyes kísérletek között (5.2.2. ábra). Általánosságban a CBF 50 % alá esett a kérgi terület 8 %-án, 50-90 % között mozgott a kérgi felszín kb. 61 %-án, és 90 % felett maradt a terület 31 %-án. A mért adatok megfeleltethetők a modellben mágneses rezonancia vizsgálattal (magnetic resonance imaging, MRI) megállapított értékeknek.²⁵⁵ A koponyaablak-preparátum korlátaiból adódóan csak a feltárt kérgi terület áramlásviszonyait tudtuk jellemezni, azonban a mikroembolizáció szubkortikális területeket is érint.²⁵⁵ Munkánk során az iszkémia indukció utáni akut, 60 perces időtartamot vizsgáltuk. Hosszabb távú utánkövetés azt igazolta, hogy a CBF csökkenése az iszkémia indukciója után 2 hétig is fennáll, melyhez jellemzően iszkémiás léziók kialakulása társul.²⁵⁵



5.2.1. ábra. A piális arteriolákban tapasztalt áramláscsökkenés, és szövettani léziók kialakulása a mikroembolizációt követően. **A:** A zárt koponyaablak helyét kék négyzet jelöli a patkány parietális kége felett, a bregmától (Br) kaudálisan. A négyzetet átszelő piros vonal az A₁₋₂ panelen bemutatott koronális agyszeletek mintavételi helyét adja meg. **A₁₋₂:** Nyilak jelölik a 2,3,5-trifeniltetrazólium-klorid (TTC) festéssel megjelenített fokális kérgi infarktust (A₁), és egy kiterjedt kérgi léziót (A₂) reprezentatív agyszeleteken. **A₃₋₄:** Kérgi mikroinfarktusok tipikus képe hematoxilin-eozinnal festett metszeteken. A koronális metszeti rajzokon a szövettani felvételek helyét kis négyszögek adják meg. **B₁:** A piális érhalózat lefutása a koponyaablak területén zöld megvilágítás mellett (540-550 nm). A felvétel a mikroembolizációt követően készült, amikor a mikropartikulumok már megjelentek a piális arteriolákban. A fehér kerettel kijelölt terület a B₂ panelen kinagyítva jelenik meg. **B₂:** A A B₁ felvételtől kinagyított területen a fekete nyíl két egymás melletti mikropartikulumra mutat (d=45-56 μ m), amelyek megrekedtek az ér lumenben. **B₃:** B₂ felvétel kiemelt része, melyen két érdeklődési területet adtunk meg egy arteriolán (vascular region of interest, ROIv). A ROIv1 az elakadt mikropartikulumoktól proximálisan (nyugalmi érátmérő: 50 μ m), a ROIv2 tőlük disztálisan (nyugalmi érátmérő: 33 μ m) helyezkedik el. Az áramlás dinamikáját (B₄) a ROIv1 és ROIv2 területéről olvastuk ki a lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (LASCA) nyert áramlási térképsorokból. A fehér nyilak az áramlás irányát szemléltetik. **B₄:** Az artériás vérátáramlás változása a B₃ panelen megadott pozíciókban. A nyilak a mikropartikulumok elakadásának időpontját jelölik.

Infarktuszos régiók megjelenését mi is igazoltuk 24 órával a mikroembolizáció után. A szövettani vizsgálatot külön állatcsoporton hajtottuk végre, mert a koponyaablak preparátum nem tette lehetővé az állatok 24 órás túlélését. A szövettani értékelésre előkészített hét állatból öt esetén mutatott a TTC festés az ipsilaterális oldalon infarktuszos zónát (**5.2.1. ábra, A₁₋₂ panel**). Három állatban kiterjedt kérgi, hippokampális és szubkortikális léziókat figyeltünk meg (**5.2.1. ábra, A₂ panel**); további két állat agyában a szubkortikális érintettség mellett a frontoparietális kéregben kisebb, fokális léziók jelentek meg (**5.2.1. ábra, A₁ panel**). A hematoxilin-eozin metszeteken jól kivehető mikroinfarktuszokat azonosítottunk (**5.2.1. ábra, A₃₋₄ panel**). A fennmaradó két állat mintáiban nem találtunk lézióra utaló jellemzőket; ezek valószínűleg megfeleltethetők annak a képkészítésre előkészített négy kontroll állatnak, amelyekben a mikropartikulumok nem érték el az agykéregtet. Az eredmények alapján modellünk reprodukálja az iszkémiás agysérülések jellegzetességeit.

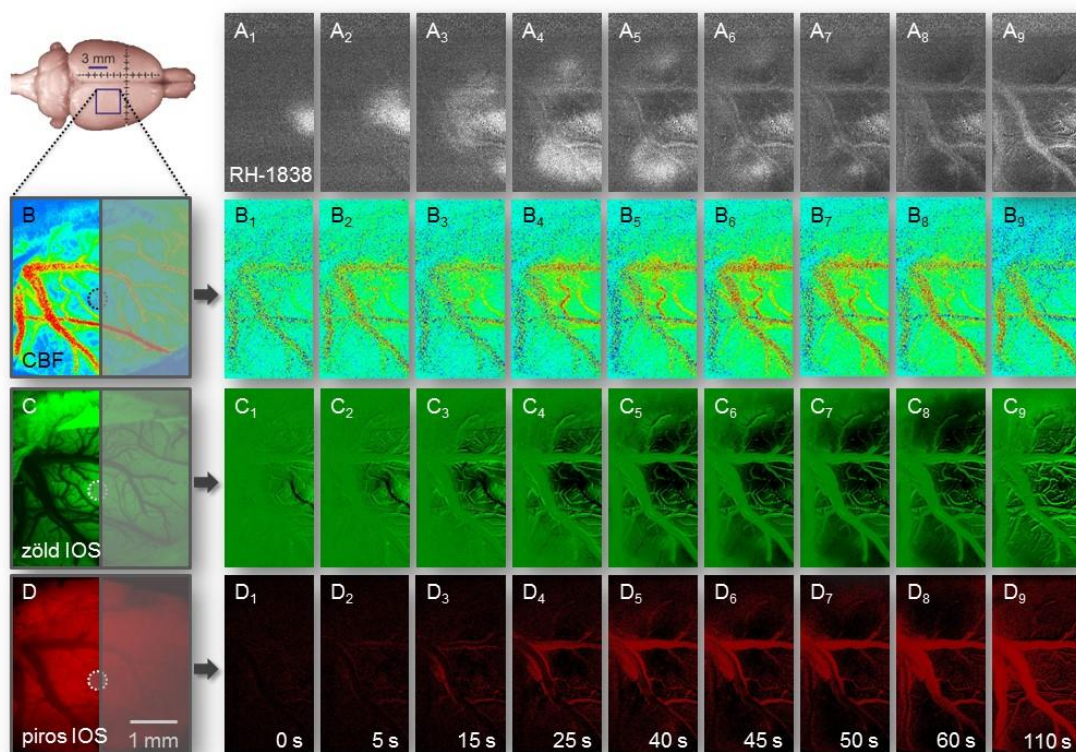


5.2.2. ábra. Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) heterogén területi eloszlása mikroembolizációt követően. **A₁₋₂**: A teljes-kép analízishez használt áramlási térképek a CBF heterogenitását mutatják be két reprezentatív kísérlet révén. A fekete-fehér felvételeken a látótér piális érhálózatja rajzolódik ki zöld megvilágításnál (540-550 nm). A hamis színezésű áramlási térképek, melyek lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (LASCA) az iszkémia indukciója után készültek, a fekete-fehér képeken bemutatott látótérnek felelnek meg. A színekkel kódolt CBF tartományokat a B panel táblázatában adtuk meg. A CBF térképeken látható az áramlás területi eloszlásának változatossága egy adott látótéren belül, és az egyes kísérletek között. **B**: A táblázatban az egyes CBF tartományokba eső kérgi felszín arányát átlag±stdev (n=7) formában adtuk meg a teljes hasznos területhez viszonyítva.

A terjedő depolarizációk fókusza

Az iszkémia során spontán jelentkező SD-eket az RH-1838 képsorokon azonosítottuk. A hét kísérletben összesen 31 SD-t regisztráltunk, melyek mind a mikroembolizáció után alakultak ki. A 60 perces felvételeken kísérletenként 2-12 SD eseményt figyeltünk meg. Összesen öt SD fókusz esett a látótérre; a többi esemény a feltárt kérgi területen kívülről eredt, és onnan terjedt be a koponyaablak alá. Az öt SD-t, melyek a fókuszból radiálisan terjedtek tova, négy állatban regisztráltuk, a mikroembolizáció után 20,4±17,6 perccel. Három esetben az események fókuszában a szövet gyorsan regenerálódott (tranzien SD), egy esetben a repolarizáció késleltetve zajlott le (**5.2.3. ábra**, és **5.2.4. ábra, A panel**), és egy esetben a depolarizációból nem tapasztaltunk visszatérést. A fókusztól tovaterjedve 1-1,5 mm távolságban azonban az SD az utóbbi két esetben is tranzien depolarizációvá módosult (**5.2.4. ábra, A panel**). A repolarizáció késése vagy elmaradása a szövet elmélyülő metabolikus krízisének jele.³⁵³ Az SD fókuszában tapasztaltak ennek alapján alátámasztják azt a nézetet, hogy az SD kiindulási pontjában az iszkémia mértéke kritikus. Ez különösen igaz az itt megfigyelték közül arra az SD-re, amelynek a fókuszában a repolarizáció nem történt meg; erre a területre későbbi SD-k sem terjedtek rá. Az SD terjedésének mintázatáról ismert, hogy az iszkémiás sérülés gócpontjait elkerüli.²⁰⁸ Kísérletünkben a tranzien SD-k keletkezési helyére időben később, távolabb kialakuló események ráterjedtek, ami bizonyítéka a szöveti homeosztázis rendeződésének tranzien események után.

Az SD terjedési sebessége a fókusztól távolodva csökkent (a fókusznál 6,5±4 mm/min; 1 mm távolságban 3,9±1,6 mm/min; **5.2.4. ábra, B panel**). Az SD terjedésének számítógépes modellezése szerint a terjedési sebesség akkor magas, ha az SD révén megemelkedett intersticiális K⁺ szint rendeződése gátolt, ha az extracelluláris tér beszűkül (pl. sejtduzzadás miatt), vagy az extracelluláris glutamát koncentrációja emelkedik.⁴²³ A hipoxia is fokozza a terjedési sebességet, a normoxiás körülményekhez képest, kb. 1 mm/min-el.³ Így a terjedési sebességgel kapcsolatos eredményeink is azt sejtetik, hogy leginkább az SD fókuszához közel eső szövet van kitéve iszkémiás károsodásnak.

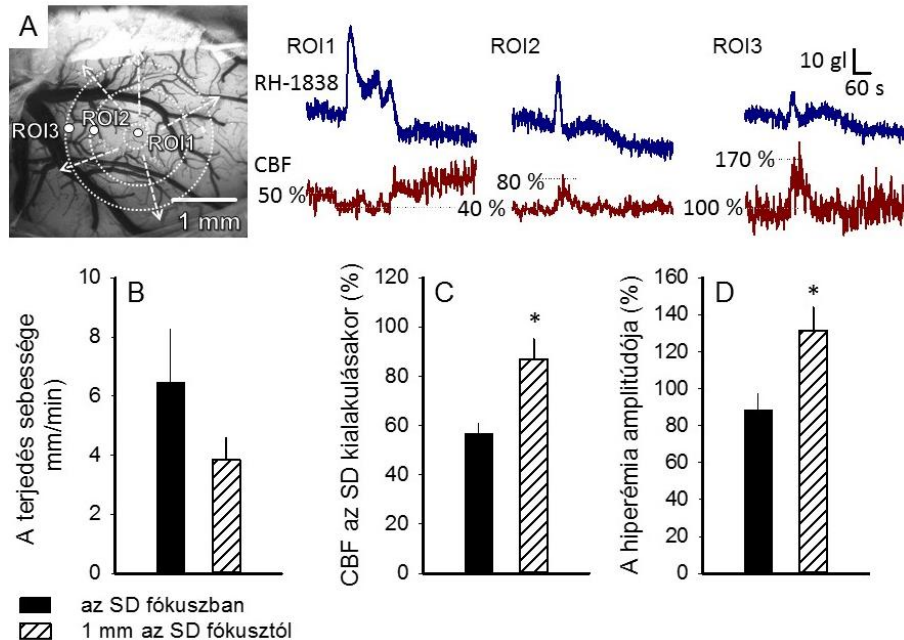


5.2.3. ábra. Terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) kialakulásának multi-modális, képi megjelenítése multifokális előagyi iszkémia mikroembolizációs modelljében. **A**₁₋₉: A feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcencia-intenzitásának változása az SD kialakulásának és tovaterjedésének függvényében. **B**₁₋₉: Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) megjelenítése lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA). A melegebb színek a magasabb áramlású területeket jelölik. **C**₁₋₉: Az agyi térfogat (CBV) jellemzése a visszaverődő fény intenzitása alapján (IOS) zöld megvilágítás mellett ($\lambda=540-550$ nm). **D**₁₋₉: Piros IOS ($\lambda=620-640$ nm) felvételek a hemoglobin szaturációjának becslésére (kisebb intenzitás erősebb deszaturációnak feleltethető meg). **B**, **C**, **D**: A teljes látótér a különböző modalitásokkal a reprezentatív kísérlet alapszakaszából. Az egyes képeket tíz egymást követő eredeti felvétel átlaga adja. A képek rosztrális felét letakartuk, hogy az 1-9 számozású sorozatokon bemutatott kaudális régiót kiemeljük. A szaggatott körvonal a vizsgált SD fókuszát jelöli. Az 1-9 számozású RH-1838, CBF, zöld és piros IOS képsorokat háttérkivonás, öt pontos mozgóátlag alkalmazása, és a kontraszt optimalizálása révén kaptuk. A CBF, zöld és piros IOS képeket szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. Az RH-1838 intenzitás-változását és a CBF dinamikáját a reprezentatív SD-re nézve az **5.2.4. ábra A panel** mutatja be.

Az SD-k tipikusan ott keletkeztek, ahol a látótéren belül a CBF a legalacsonyabb volt, átlagban 57 ± 9 %. Ennek megfelelően az SD fókuszától fokozatosan távolodva az SD-t közvetlenül megelőző CBF magasabb tartományban mozgott. Így például a fókuszról 1 mm távolságban 87 ± 2 % értéket vett fel, a fókuszban mért 57 ± 9 %-hoz képest (**5.2.4. ábra, C panel**). Az SD kiváltási helyére az SD-hez társuló hiperémia nem volt jellemző ($n=3$; **5.2.4. ábra A panel**), vagy elhanyagolható mértékűnek bizonyult ($n=2$). Az SD fókuszától távolodva a terjedő eseménnyel a hiperémia mértéke fokozódott (**5.2.4. ábra, D panel**); az SD elhaladása után a CBF pedig visszatért az SD-t megelőző szintre. Mindezek arra utalnak, hogy az SD az egységes szerkezetű kéregben ott alakul ki, ahol a CBF csökkenése elér egy kritikus, alacsony küszöbértéket.³⁷⁴ Ezt követően a neurovaszkuláris csatolás is ebben a régióban lesz a legkevésbé hatékony.

Bár a fokális iszkémia rágcsló modelljében az SD-k fókuszát korábban a növekvő iszkémiás mag régió peremére tették,^{54,269} kísérleteinkben hasonló összefüggést nem állapítottunk meg. Elképzelhető, hogy az iszkémia a kísérleteinkben tanulmányozott, akut, kezdeti 60 perces szakaszában a későbbi mag régió helyén még csak mikroinfarktuszok jelentek meg,²⁸² melyeket a

képkalkító rendszer viszonylag alacsony felbontása miatt nem észleltünk. Ugyanakkor MRI vizsgálatok tanúsága szerint az iszkémiás szövetben az SD-k nem csupán a mag régió közvetlen szomszédságában, hanem attól távol is kialakulhatnak,³¹⁸ illetve az iszkémia enyhébb formái is kiválthatnak SD-t.⁹⁹



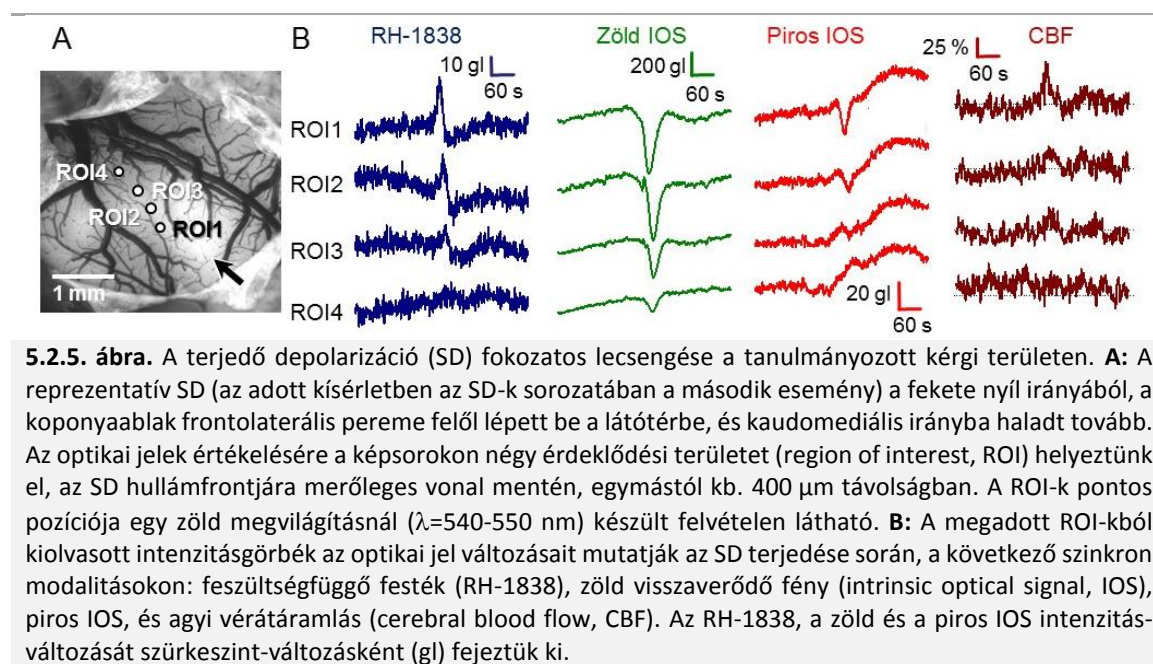
5.2.4. ábra. A terjedő depolarizáció (SD) és az agyi vérátáramlás (CBF) jellemzése az SD fókuszában közelében. **A:** Az SD-t megjelenítő feszültségfüggő festék (RH-1838) jelintenzitását, és a csatolt CBF változás kinetikáját három kijelölt területéről (region of interest, ROI) olvastuk ki az SD fókuszában (ROI1) és attól távolodva (ROI2, ROI3). A ROI-k pozícióját a zöld megvilágításnál ($\lambda=540-550$ nm) készült felvétel mutatja be. A képen a fehér szaggatott vonallal megadott körök és nyilak az SD radiális irányú terjedését illusztrálják. Az RH-1838 fluoreszcencia-változását szürkeszint-változásként (gl) adtuk meg. **B:** Az SD terjedési sebessége az SD fókuszában, és attól 1 mm távolságban. **C:** A helyi CBF röviddel az SD keletkezése előtt az SD fókuszában, és attól 1 mm távolságban. **D:** Az SD-vel járó hiperémia maximális amplitúdója az SD fókuszában, és attól 1 mm távolságban. Az adatokat átlag \pm stdev formában adtuk meg (n=5). A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$).

A látótérben áthaladó terjedő depolarizációk

A távoli fókuszból a látótérbe belépő SD-eket mind tranziens depolarizáció jellemezte. A terjedési sebessége 1,8 és 6,2 mm/min közé esett (átlagban $3,02 \pm 1,08$ mm/min). Az SD-k döntő többsége frontális/frontolaterális irányból érkezett (n=19), néhány esemény a laterális perem felől lépett be a látótérbe (n=5), ritkán kaudális irányból terjedtek előre (n=2). A terjedés meghatározó iránya tehát fronto-kaudális volt. Hasonló terjedési mintázatot írtunk le a hirtelen szívmegállás után kialakuló SD kapcsán is (4.2.2. fejezet). Az SD-k irányultsága arra utal, hogy az SD-k zöme a frontolaterális kéregben, vagy a kéreg alatti striátumban keletkezett. A striatális eredetet támasztják alá azok a megfigyelések, melyek szerint a striátumban kialakuló SD-k a *claustrum*-on és a *nucleus accumbens*-en áthaladva érik el a kéreg területét.^{392,401}

Egy kísérleten belül az egymás után jelentkező SD-k terjedési iránya random módon eltért, illetve az SD-k sorába illeszkedve jelentek meg azok a fentebb részletezett események is, amelyek fókusza a látótérre esett. A terjedési mintázat és az SD-k eredetének változatossága az iszkémia multifokális jellegéből adódott. Az SD-k sokszínűsége miatt az eredményeket nehéz általánosítva tárgyalni, ezért az alábbiakban reprezentatív példák révén ismertetjük következtetéseinket.

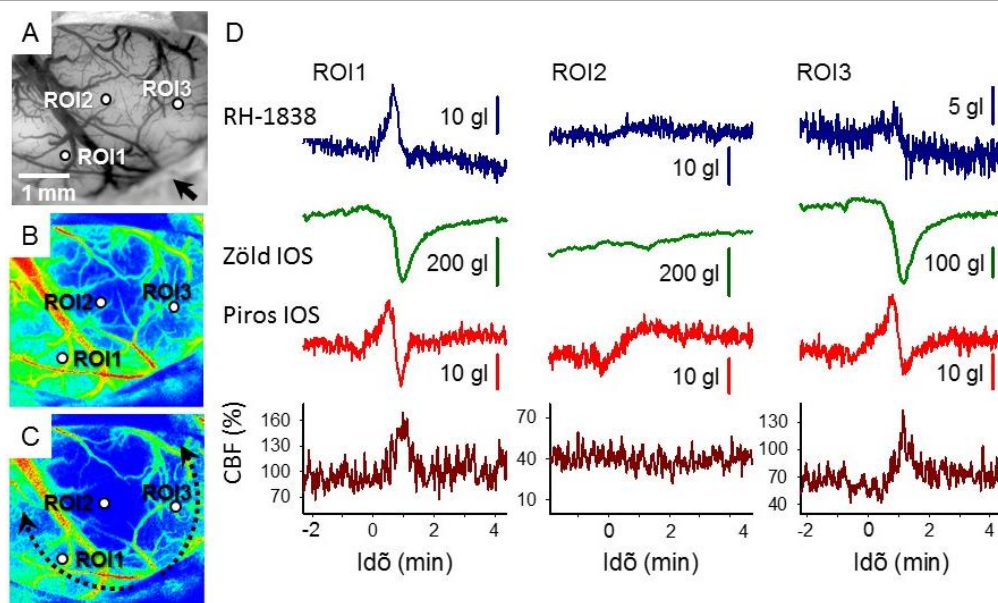
Több alkalommal figyeltük meg, hogy a látótérbe lépő SD a terjedése során fokozatosan elhal. Az **5.2.5. ábra** segítségével követhetjük egy ilyen jellegű esemény lecsendesedését. Az SD megjelenése előtt a látótérben a CBF egyöntetűen 60 % körül mozgott. Az SD frontolaterális irányból terjedt; érkezését a belépési ponthoz legközelebbi ROI-n az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának meredek fokozódása és az SD-hez csatolt 130 %-os hiperémia jelezte. A koponyaablak kaudomediális pereme felé haladva mind az RH-1838 jelintenzitás, mind a hiperémia mértéke fokozatosan csökkent, majd a legtávolabbi mintavételi helyen egyik modalitás sem mutatott SD-re jellemző kitérést. Hasonlóképpen a CBV helyi növekedését intenzitás-csökkenéssel jelző zöld IOS is egyre kisebb mértékű CBV növekedést mutatott. Végül a hemoglobinnal deszaturációját intenzitás-gyengüléssel mutató piros IOS SD-hez társuló kitérése is egyre kisebb lett.



Az SD lecsengését *ex vivo* csirke retina preparátumban már korábban megfigyelték, a preparátum jellegéből adódóan hemodinamikai jellemzők nélkül.²⁴⁷ Az SD-hez csatolt hiperémia mértékének az SD terjedése során tapasztalt fokozatos csökkenésére stroke betegek iszkémiás agykérgében is találtak példát.⁴¹⁵ Nem világos azonban, mi áll az SD lecsengésének hátterében. Az SD-t gátló tényező lehet, ha a szövet egy megelőző SD esemény refrakter periódusában van. Preparátumainkban a látótéren áthaló SD események kb. 8-10 perces késéssel követték a korábbi, tranzienst SD-eket. Ez az időtartam elengedően hosszú a nyugalmi membránpotenciál SD-t követő helyreállásához, de túl rövidnek bizonyulhat az iszkémiás agykérgében az ionhomesosztázis, és különösen a szövet metabolikus egyensúlyának rendeződéséhez. A refrakter állapoton kívül gátolhatják az SD terjedését olyan szöveti ion grádiensek, amelyek a depolarizáció kialakulásának nem kedveznek; ilyen például a csökkenő extracelluláris K^+ szint a sejtek fokozott K^+ felvétele miatt, vagy a Mg^{2+} emelkedő koncentrációja.^{326,395,396} Végül az SD terjedésének gátlásában az asztrociták akvaporin csatornáin keresztül zajló elégtelen víztranszport is szerepet játszhat.¹³¹

Két kísérletben a videókon számos olyan SD-t azonosítottunk, amelyek terjedésük során a kéreg egy meghatározott területét kikerülték. A lecsengő SD-ktől eltérően ezeket az eseményeket nem az SD fokozatos elhalása jellemezte, hanem éles körvonalak mentén terjedve kerültek ki alacsonyan perfundált szöveti régiókat. Ennek megfelelően hullámfrontjuk is szabálytalannak mutatkozott. A terjedési tulajdonságokat az **5.2.6. ábrán** bemutatott reprezentatív SD szemlélteti.

A lecsengő SD-eket megelőző, térben jellemzően egyeneses perfúzióval szemben a szabálytalanul tejedő SD-eket heterogén áramlásviszonyok előzték meg. Az áramlás a kiragadott példában (5.2.6. ábra) a látótér különböző területein azonos időben 40-100 % között változott. A frontolaterális irányból érkező SD a látótér legalacsonyabban perfundált zónáját (kb. 40 %) kerülte ki. Az elkerült területen a kísérlet korábbi szakaszában permanens depolarizációt nem regisztráltunk.



5.2.6. ábra. A terjedő depolarizáció (SD) szabálytalan hullámfronttal hipoperfundált régiót kerül el. A reprezentatív SD (az adott kísérletben az SD-k sorozatában a harmadik esemény) a fekete nyíl irányából, a koponyaablak frontolaterális pereme felől lépett be a látótérbe. **A:** Az optikai jelek értékelésére a képsorokon három kijelölt területet (region of interest, ROI) helyeztünk el az SD hullámfrontjával párhuzamosan, egymástól kb. 1,36 mm távolságban. **B-C:** Lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA) készült agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) térképek a CBF területi megoszlását szemléltetik a kísérlet alapszakaszában (B), és közvetlenül az SD előtt (C). A képeket szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. A melegebb színek magasabb CBF-nek feleltethetők meg. A ROI-kat úgy helyeztük el, hogy eltérő perfúziójú területeket monitorozzanak. A fekete szaggatott nyilak az SD térbeli terjedési mintázatát illusztrálják a látótér közepét elfoglaló, alacsony perfundált területet elkerülve. **D:** A megadott ROI-kból kiolvasott intenzitásgörbék a feszültségfüggő festékre (RH-1838), a zöld visszaverődő fényre (intrinsic optical signal, IOS), a piros IOS-re, és a CBF-re vonatkoznak az SD elhaladása során. A ROI2-n, melyet az legalacsonyabban perfundált régióra helyeztünk, az SD-re jellemző jelintenzitás-változás nem rajzolódik ki. Az RH-1838, a zöld és a piros IOS intenzitás-változását szűrkeszint-változásként (gl) fejeztük ki.

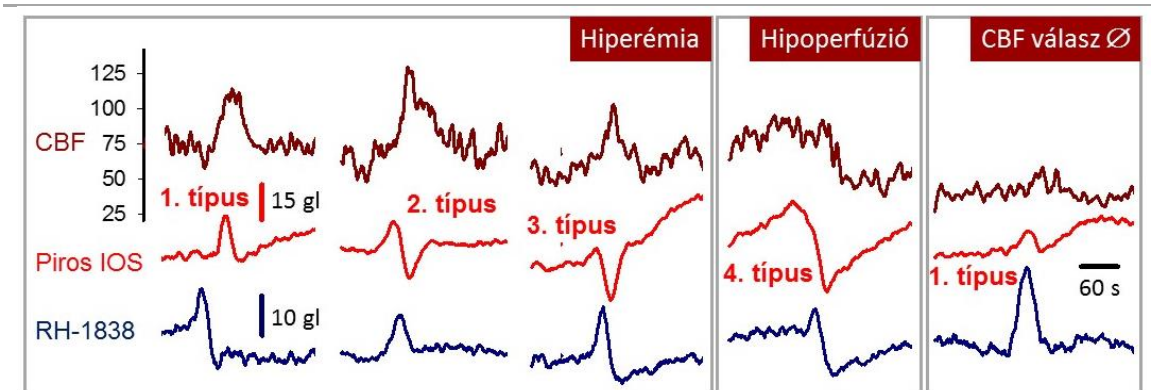
Megfigyelésinkhez hasonlóan MRI vizsgálatok hívták fel a figyelmet arra, hogy röviddel a patkányban kialakított MCAO után a keletkező SD-k nem terjedtek be olyan kérgi zónákba, melyek súlyos perfúziós deficitet szenvedtek.³¹⁸ LASCA módszerrel pedig a fokális iszkémia patkány és macska modelljében azonosították a primer iszkémiás fókusz körül keringő SD-eket.²⁶⁹ Az SD az iszkémiás sérülés gócpontjait, illetve iktális aktivitás alatt álló régiókat kerül el.^{207,208} Kísérleteinkben nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az SD által elkerült zónában infarktus alakult volna ki, hiszen permanens depolarizáció nem érintette a területet. Az iszkémiás agysérülés kiválthat fokális görcsaktivitást,¹⁶⁸ amely patkány mikroembolizációs modellben is bizonyítottan létre jöhet,³⁹⁰ de módszereink nem tették lehetővé a görcsaktivitás létrejöttének igazolását. A rendelkezésünkre álló eredmények alapján tehát azt a megállapítást tehetjük, hogy az SD nem

haladt át a látótérben a legsúlyosabban hipoperfundált régió, bár a terület valószínűleg nem szenvedett a korábbiakban infarktust.

A terjedő depolarizációhoz csatolt agyi vérátáramlási válasz jellegzetességei

Az SD-t követő CBF változás jellegzetességei a közelmúltban intenzív kutatások tárgyát képezték. Az SD-re adott, ép keringésű kéregre jellemző CBF változás fázisai (2.2. fejezet) (2.2.2. ábra, A panel) az iszkémia során arányaikban eltolódnak, a perfúziós válasz elégtelenné válik (2.2. fejezet) (2.2.2. ábra, B panel).^{14,178,344}

Kísérleteinkben a megfigyelt SD-khez társuló CBF változás három típusát különítettük el (5.2.7. ábra). Az áramlási válaszok zömét határozott, tranziens hiperémia jellemezte (n=30), átlagban 130±19 %-os csúcértékkel, mely 55±21 %-os növekedésnek felelt meg az SD események előtt közvetlenül mért perfúzióhoz képest (75±13 %). A CBF változás egymást követő szakaszai közül a hiperémiát megelőző hipoperfúziót, illetve a hiperémiát követő oligémiás fázist a LASCA áramlási térképek nem jelezték (5.2.7. ábra). A kísérleteinkben tapasztaltakhoz hasonlóan a kezdeti, rövid hipoperfúzió és a késői oligémia olyan esetben marad el, amikor a sorban ismétlődő SD-k rövid időközönként követik egymást,¹⁴ és a szöveti perfúzió az egyes SD-k után tartósan szuboptimális szinten marad valószínűleg az érösszehúzó 20-hidroxiieikozatetraénsav (20-HETE) hosszan fennmaradó szintézisének köszönhetően.¹³⁴

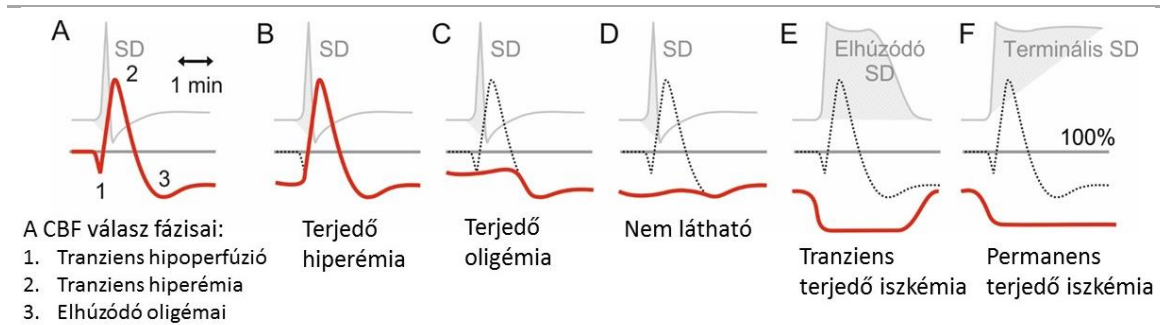


5.2.7. ábra. A terjedő depolarizációt (SD) követő hemodinamikai válasz megfigyelt típusai. Az agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz időbeli lefutását bemutató, reprezentatív idősorok (sötét vörös) alatt a piros visszaverődő fény (intrinsic optical signal, IOS) intenzitás-változása látható. A piros IOS jel eltérő kinetikája alapján, az ábrán jelölt négy típust különböztettük meg. Az SD megjelenését a feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciája igazolja. A regisztrátumokat öt pontos mozgóátlaggal simítottuk. Az RH-1838 és a piros IOS intenzitás-változását szürkeszint-változásként (gl) fejeztük ki.

A megfigyelt SD-k közül egy esetben, az iszkémia indukciója után kis késéssel, kizárólag áramlásesést tapasztaltunk, és a kialakult hipoperfúzió a sorban következő SD bekövetkeztéig (kb. 8 perc múlva) sem is rendeződött (5.2.7. ábra). A legelfogadottabb nézet szerint, a megfigyelthez hasonló lefutású terjedő iszkémia a sérült agykéregben úgy jön létre, hogy a kezdeti hipoperfúzió meghatározóvá válik, elfedve a hiperémiás fázist.^{14,178,344} Az SD és a tipikus CBF változás közötti csatolás időbeliségét figyelembe véve a terjedő iszkémia kezdete – a korai hipoperfúzióhoz hasonlóan – a depolarizáció meredeken lefutó szakaszára esik (5.2.8. ábra; E-F panel). Az itt regisztrált áramlás-csökkenés kezdete azonban az SD utáni hiperpolarizációval mutatott időbeli egyezést (5.2.7. ábra). A terjedő iszkémia másik jellemzője, hogy a hipoperfúzió során a szövet depolarizált marad, a repolarizáció csak a tranziens terjedő iszkémiából történő visszatérés után, az áramlás emelkedésével történik meg (5.2.8. ábra, E panel). A megfigyelt SD ellenben tranziens esemény volt, a repolarizáció egy percen belül lezajlott az elhúzódó hipoperfúzió mellett (5.2.7. ábra). Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a megfigyelt esemény nem terjedő iszkémia,

hanem terjedő oligémia volt, a hiperémiás szakasz elmaradása mellett (5.2.8. ábra, C panel). Feltételezésünket alátámasztja, hogy az esemény a mikroembolizáció után az SD-k sorában elsőként jelentkezett, melyre jellemző az elhúzódó oligémia kialakulása (4.1.5. ábra). Lényeges megállapítás tehát, hogy az áramlásesés nem tekinthető minden esetben terjedő iszkémiának.

Végül az elemzett események közül egy alkalommal az SD-hez társuló CBF változás egyik fázisát sem sikerült azonosítani (5.2.7. ábra). A CBF válaszreakció valószínűleg olyan feltételek mellett marad el, amikor az iszkémia révén az erek már maximálisan kitágultak, ezzel meghúsva a további vazodilatációt. Súlyosabb esetben elképzelhető, hogy az iszkémia károsítja a vazodilatácót létrehozó jelátviteli utakat is.¹⁹⁶



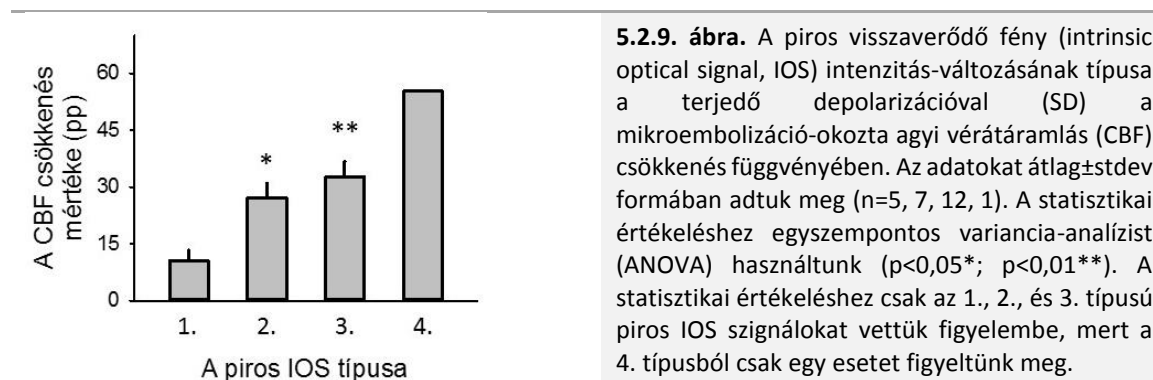
5.2.8. ábra. A terjedő depolarizációhoz (SD) csatolt lokális agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz lehetséges időbeli mintázata az ép (A) és az iszkémiás agykéregben (B-F), balról jobbra a perfúziós elégtelenség súlyosbodásának sorrendjében. A piros görbék a CBF változás lefutásának elméleti lehetőségeit ábrázolják saját eredményeink és mások megfigyelései alapján. A fekete szaggatott vonal a B-F paneleken a CBF változás mintaszzerű alakját mutatja az összehasonlíthatóság érdekében. A szürke grafikonok az SD-t a DC potenciál kitéréseként adják meg (a negatív irány felfelé mutat), amely transziens (A-D panel), elhúzódó (E panel), illetve terminális (F panel) eseményként jelentkezhet. Az alapáramlás (100 %) minden esetben a vízszintes szürke vonal jelöli.

A CBF válaszreakció mellett, 25 SD-t értékelve, a piros IOS intenzitásának kinetikája is változatosnak bizonyult (5.2.7. ábra). A piros IOS jelet alapvetően bifázisosnak tekintettük. A kezdeti intenzitás-fokozódást, amely időben a hiperémia felfutó szárának felelt meg, még a hiperémia csúcsát megelőzően transziens intenzitáscsökkenés váltotta fel. A piros IOS intenzitásának minimuma időben a hiperémia csúcsára esett. A két fázis aránya szerint az SD-hez társuló piros IOS jelet négy típusba soroltuk (5.2.7. ábra). Az első három típus hiperémiához társult. Az 1. típusban a kezdeti IOS-intenzitásfokozódás dominált (n=5), a 2. típusban a két fázis részesedése közel egyenlő volt (n=7), míg a 3. típust leginkább a transziens intenzitáscsökkenés jellemezte (n=12). A 4. típusnak azt az esetet tekintettük, amikor a hipoperfúzió mellett a piros IOS intenzitás már az áramlásesést megelőzően meredeken csökkent, és később fokozatosan, lassan tért vissza.

A kéreg optimális perfúziója mellett, KCl-al kiváltott SD-vel a piros IOS intenzitás az itt megállapított 2. típus szerint alakul,³⁶⁴ melyet a deoxigenált hemoglobin 15-20 %-os csökkenésének feleltettek meg.^{113,364} Kísérleteinkben az 1. típusban az IOS monofázisos intenzitásfokozódása a deoxigenált hemoglobin még kifejezettebb csökkenését feltételezi, mely az áramlás szinkron emelkedésével együtt a hemoglobin szaturációjára utal. Következésképpen a hiperémia, amely a hemoglobin szaturációjával párosul, minden bizonnyal elősegíti a szövet metabolikus egyensúlyának rendeződését az SD-t követően, így a funkció helyreállítása szempontjából kedvezőnek tekinthető. Összességében az értékelt SD-k feléhez a hiperémia mellett 1. vagy 2. típusú piros IOS szignál társult. Ez azt sejteti, hogy mérsékelt iszkémiás feltételek mellett az ilyen típusú SD-okozta metabolikus igény teljesül, az egyes SD-k terjedése nem jelent közvetlen veszélyt a szövetre.

Ugyanakkor a 3. és 4. típusba sorolt piros IOS szignál – az iszkémiás kéregben végzett NIRS vizsgálatok eredményeivel összhangban – a hemoglobin deszaturációjának a jele,⁴¹⁷ és valószínűleg megfelel a NADH SD-vel járó redukciójának oxigényhiányos szövetben.³⁵³ Ezek alapján a 3. és 4. típusú piros IOS szignál az SD szövetkárosító jellegére utalhat.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a piros IOS szignál lefutását meghatározza-e az aktuális szöveti perfúzió. Az SD-t közvetlenül megelőző áramlásérték, vagy az SD-hez csatolt hiperémia csúcsértéke és a piros IOS jel típusa között nem találtunk összefüggést. Ugyanakkor a mikroembolizációval létrehozott áramlásesés mértéke előre jelezte a későbbi SD-kkel kialakuló hemoglobin-szaturáció dinamikáját (5.2.9. ábra, A panel). Minél nagyobb kezdeti áramlásesét mértünk, annál nagyobb valószínűséggel kaptunk az SD eseményekkel a hemoglobin deszaturációjára utaló piros IOS jelet (ANOVA: $F=5.978$, $p \leq 0,009^{**}$).



5.2.9. ábra. A piros visszaverődő fény (intrinsic optical signal, IOS) intenzitás-változásának típusa a terjedő depolarizációval (SD) a mikroembolizáció-okozta agyi vérátáramlás (CBF) csökkenés függvényében. Az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg (n=5, 7, 12, 1). A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$). A statisztikai értékeléshez csak az 1., 2., és 3. típusú piros IOS szignálokat vettük figyelembe, mert a 4. típusból csak egy esetet figyeltünk meg.

Összefoglalva, multifokális előagyú iszkémia modellünkben a spontán jelentkező SD eseményekkel túlnyomó részt hiperémiát kaptunk; terjedő iszkémiát egy esetben sem figyeltünk meg. Valószínűsíthető, hogy a modellben kialakított iszkémia mértéke kedvezett az SD-k kialakulásának, de nem volt kellően súlyos ahhoz, hogy hipoperfúziós áramlási válaszok jöjjenek létre. Eredményeink szerint a hiperémia mértéke önmagában nem jelzésértékű az iszkémiás agykérgen áthaladó SD metabolikus következményeire nézve. A hiperémia során a hemoglobin oxigéntelítettsége az iszkémia mértékének függvényében eltérő dinamikát követve változik, ami árnyalja az SD-vel járó anyagcsere-folyamatok hatékonyságát. Ha az iszkémia eredendően súlyosabb mértékű, az SD-re adott, megtartott hiperémia mellett a hemoglobin deszaturációja dominál, ami elégtelen oxigénellátást okozva veszélyeztetheti az idegsejtek túlélését. Munkánk alapján az egyes SD események neurodegeneratív következménye nem egyértelmű, viszont az ismétlődő események összeadódva, a CBF változás elégtelensége révén szövetkárosító hatásúak lehetnek.¹⁰⁸

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Kutatásaink során sikeresen alkalmaztuk a laborunkban kialakított multi-modális képalkotó rendszert konkrét idegéletteni folyamatok tanulmányozására. Kihasználtuk a módszer azon egyedi adottságát, hogy az agykérgi mezőpotenciál-változásokat és a csatolt hemodinamikai eseményeket térben és időben egyaránt meg tudja feleltetni egymásnak.

Fontos megállapításokat tettünk az SD, és az SD-hez társuló CBF változás térbeli mintázatáról az iszkémia által különböző mértékben érintett kérgi területeken, illetve a hemoglobin oxigéntelítettségének dinamikájáról. Rámutattunk, hogy az SD spontán megjelenése egy hipoperfúziós küszöbhez köthető. Bizonyítottuk, hogy az SD ideálisan egyenletes, radiális irányú terjedése a multifokális iszkémiára jellemző, heterogén áramlási viszonyok mellett szabálytalan mintázatúvá válik. A csatolt CBF változás lefutása az SD fókuszától távolodva módosul, a

hiperémiás komponensnek egyre nagyobb teret adva. Végül megmutattuk, hogy az azonos mértékű hiperémiás válaszokkal a hemoglobin szaturációja változatos dinamikát követ, és a mikroembolizáció-okozta áramlásesés elmélyülésével az SD során a hemoglobin deszaturációja válik egyre hangsúlyozottabbá.

Munkánk felhívja a figyelmet arra, hogy az ismételt kialakuló SD-k kórélettani szerepet tölthetnek be a kisebb mikroembólusos agyi infarktuszok, a pulmonáris vagy kardiális arteriovenózus sönt komplikációjaként fellépő stroke, és a multi-infarktus demencia esetében. Ezért a felsorolt neurológiai állapotokban az SD-k szerepét, kialakulásuk megelőzését vagy visszaszorítását érdemes mérlegelni a betegség tüneteinek enyhítésére.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Bere Z, Obrenovitch TP, Kozák G, Bari F, **Farkas E**. *Imaging reveals the focal area of spreading depolarizations and a variety of hemodynamic responses in a rat microembolic stroke model. J Cereb Blood Flow Metab. 2014;34(10):1695-705.*

5.3. A terjedő iszkémai jelensége: permanens globális előagyi iszkémia

Háttér

Az előző két fejezetben fokális előagyi iszkémia modellek segítségével elsősorban az SD-k fókuszpontját, terjedési mintázatát, és a csatolt CBF változás jellegzetességeit tanulmányoztuk. A hemodinamikai válaszok értékelésekor megfogalmazódott, hogy a modellben az iszkémia mérsékelt jellege miatt az SD-vel egyértelműen kóros CBF válaszreakció nem alakult ki. A kapott eredményeket kiinduló pontnak tekintve, további kísérleteink tervezésekor szempontként szerepelt súlyosabb iszkémiás állapot létrehozása, hogy az SD-vel a terjedő iszkémia kialakulásának feltételeit is vizsgálhassuk.

Fokális agyi iszkémiás inzultusok során a spontán SD-k eredetét iszkémiás határterületekre, mint a mag-penumbra határ teszik.¹⁶⁴ Nem világos azonban, hogy SD események létrejönnek-e globális iszkémiás állapotokban, ahol a hipoperfúzió egységesen érinti a teljes előagyat, és a fokális inzultushoz hasonló iszkémiás gócpontok nem körvonalazódnak egyértelműen. Globális iszkémia állhat elő hipovolémiás sokk, szívinfarktus és szívűtétek esetén, amikor a szisztémás keringésmegállás időtartama kritikus a neurológiai funkciók épségének megtartása szempontjából.^{117,147,180,186}

Kísérletsorozatunk célja az volt, hogy globális előagyi iszkémiában bizonyítsuk az SD szerepét, a kéregre nézve egységes hipoperfúzió mellett meghatározzuk az SD spontán kiváltásának körülményeit, és összefüggésbe hozzuk az áramlási válasz lefutását az SD konkrét jellegével.

Módszerek

Felnőtt, hím, Sprague-Dawley patkányokat (300-451 g; n=13) 1,5-2,0 % halotánnal (N₂O:O₂ 2:1) altattunk. A jobb oldali *arteria* és *vena femoralis*-ba kanült vezetünk a MABP folyamatos monitorozására, artériás vérgáz minták gyűjtésére, vérlevétellel hipovolémiás hipotenzió kialakítására, majd a kísérlet végén 0,5 ml 1 M KCl beinjektálásával a szív megállítására. A CCA-t a fentebb ismertetett módon mindkét oldalon kiperaráltuk (5.2. fejezet), és műtéti cérnával lazán alálóltottuk az artériák későbbi elzárásához (kétoldali *arteria carotis communis* elzárás, „two-vessel occlusion”, 2VO). A fonalat a nyak bőrére, közvetlenül az erek felett ejtett kis bemetszéseken keresztül vezetjük ki, majd a bőrt zártuk. Végül az állatok fejét sztereotaxiás befogóba rögzítettük, és zárt koponyaablakot alakítottunk ki a jobb parietális kéreg felett (5.1. fejezet). A kérgi felszínről a laborunkban fejlesztett multi-modális képalkotó rendszerrel, 1 Hz-es mintavételezési

frekvenciával készítettünk párhuzamos képsorokat a mezőpotenciál (RH-1838), a CBF (LASCA), a CBV (zöld IOS) és a hemoglobin deszaturációjának (piros IOS) dinamikájáról (4.2.2. fejezet).

Az adatgyűjtést 10 perc alapszakasz felvételével kezdtük, majd 2VO révén globális előagyi iszkémiát idéztünk elő. A sikeres érelzárást a baroreceptor reflex jelezte (a MABP hirtelen, tranziens emelkedése válaszul a CCA-ban létrejött perfúziós nyomásesésre). Az előagyi iszkémiát tíz perc elteltével hipovolémiás hipotenzióval súlyosbítottuk: a femorális katéterek egyikén fokozatosan, kb. 10 perc hosszan vért vettünk le addig, amíg a MABP 40 Hgmm-re csökkent. A vérlevétel után a MABP 35-40 Hgmm között állapodott meg. Húsz perccel később a kísérleteket halotán túlادagolásával, vagy KCl i.v. infúziójával fejeztük be. A szívmegállás után a regisztrációt még 10 percig folytattuk.

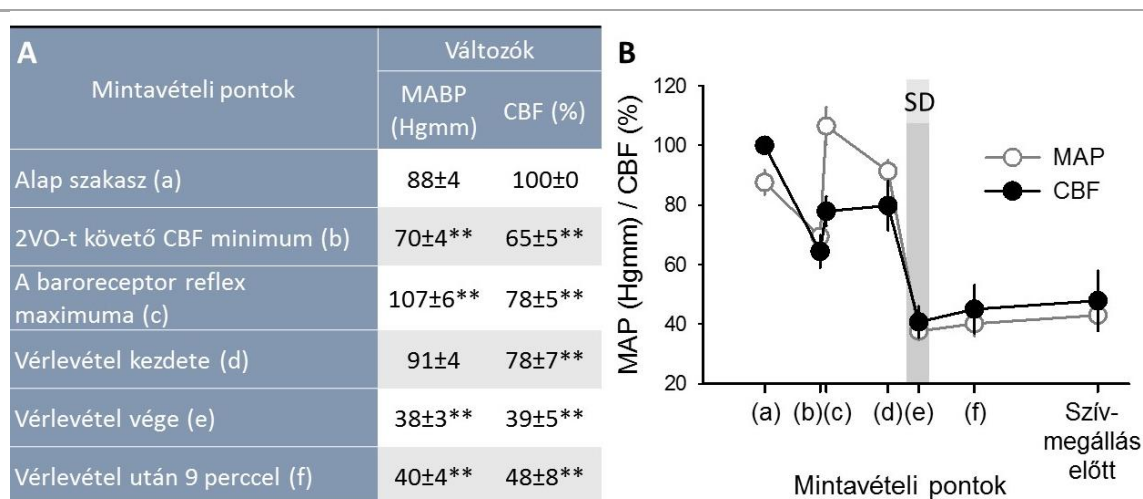
A kísérletek során a MABP és a CBF változását a következő mintavételi pontoknál határoztuk meg: a): egy perccel a 2VO előtt (alap); b): a 2VO-t röviddel követő CBF minimumnál; c): a 2VO-ra adott baroreceptor reflex MABP maximumánál; d): közvetlenül a vérlevétel megkezdése előtt; e): a vérlevétel befejezésekor; f): a vérlevétel befejezése után 9 perccel; g): közvetlenül a szívmegállás indukciója előtt. Az optikai jelek intenzitás-változásait a fentebb részletezettek szerint olvastuk ki és értékeltük (4.2.2. fejezet). Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízist SPSS szoftverrel végeztük (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.); az értékeléshez az adatsor természetétől függően egyszempontos vagy ismételt varianciaanalízist (ANOVA), illetve független T-próbát használtunk ($p < 0,05^*$); ANOVA modell esetén több csoport összehasonlítására Fisher post hoc tesztet használtunk ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

A globális előagyi iszkémiával kapcsolatos változások értékelése

A hipovolémiás hipotenzióval súlyosbított globális előagyi iszkémia modellben folyamatosan követtük a MABP és a CBF változását a hipotenzió visszaigazolására, az iszkémia súlyosságának becslésére, és a modell jellemzésére. A 2VO létrehozását először hirtelen vérnyomásesés (88 ± 4 Hgmm-ről 70 ± 4 Hgmm-re), majd tranziens vérnyomásikiugrás követte (107 ± 6 Hgmm), melyet az intakt baroreceptor reflex jelének tekintettünk.⁸¹ Az iszkémia vérlevételt megelőző fázisában a MABP az alapértéknél magasabban, 91 ± 4 Hgmm körül állapodott meg, majd a vérlevétel eredményeképp, a szisztémás vérmennyiség csökkenésével összhangban,¹²⁵ 38 ± 3 mmHg-ig süllyedt. A kísérlet további szakaszában a MABP számottevően már nem tért vissza az élettani tartományba, a szívmegállás előtt átlagban 43 ± 8 mmHg értéket mértünk (5.3.1. ábra).

A patkányban korábban megfigyeltékhez hasonlóan,⁶³ a 2VO hatására a CBF 65 ± 5 %-ra esett, a vérnyomásikiugrással egyidőben már 78 ± 5 %-ra tért vissza, és a vérlevétel megkezdéséig ettől az értéktől már lényegesen nem tért el. A CBF a fokozatos vérlevétellel párhuzamosan egyenletesen csökkent, melyet az agyi autoregulációs kapacitás kimerüléseként értelmeztünk.¹³⁸ A hipovolémiás hipotenzió kialakításának végére a CBF már csak 39 ± 5 % körül mozgott (5.3.1. ábra).

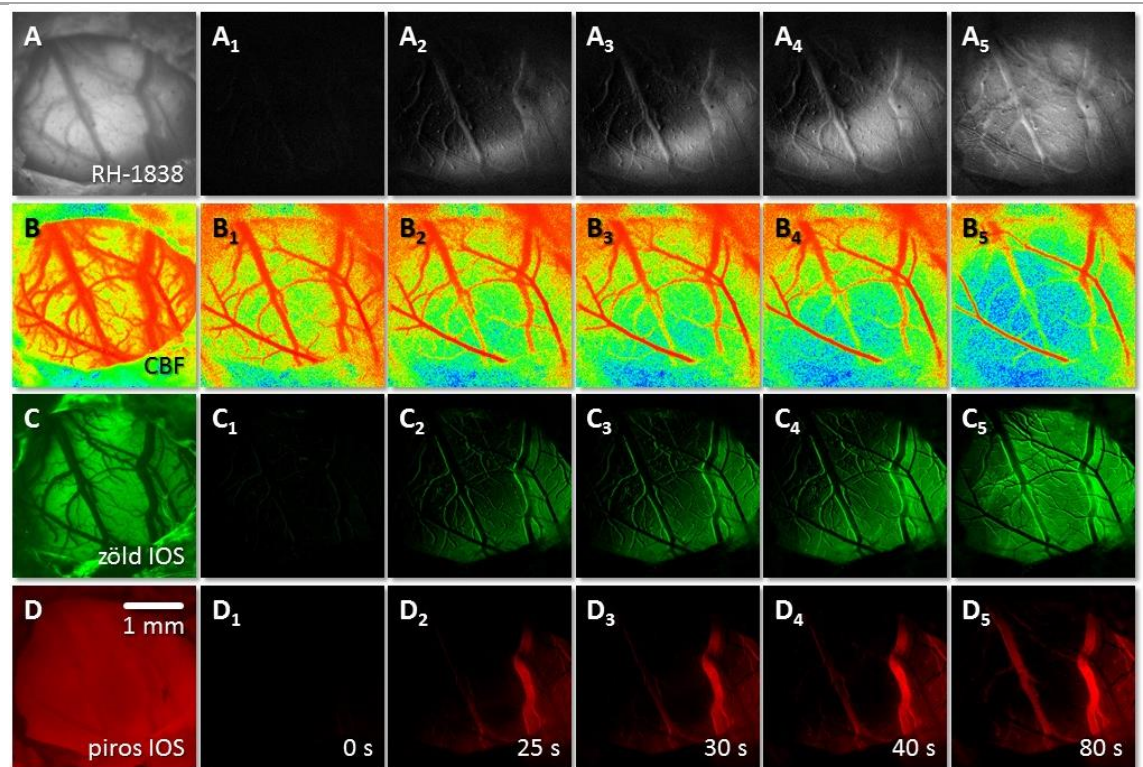
Az iszkémia indukciója az optikai jelek intenzitását is érintette. A zöld IOS az előagyi iszkémia és a későbbi hipovolémiás hipotenzió létrehozása során erősödött, ami a kérgi fényelnyelés gyengülését, azaz a CBV nyilvánvaló csökkenését tükrözte (4.2.2. fejezet). A piros IOS intenzitása a zölddel ellentétben fokozatosan mérséklődött, melynek legvalószínűbb oka az iszkémiával illetve a hipovolémiával kapcsolatos hemoglobin deszaturáció lehetett.⁴¹¹ Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitása a mezőpotenciáltól függetlenül, a piros IOS jellel szinkron gyengült, amit korábbi eredményeink alapján optikai melléktermékként értelmeztünk (4.2.2. fejezet).



5.3.1. ábra. Az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure, MABP) és az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) változása a globális előagyi iszkémia előidézése (kétoldali *arteria carotis communis* elzárás, „two-vessel occlusion”, 2VO), majd az iszkiátiát súlyosbító hipovolémiás hipotenzio (vérlevétel az *arteria* vagy *vena femoralis*-ból) következtében. Az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg (n=9). A statisztikai értékeléshez használt ismételt variancia-analízis (ANOVA) a MABP és a CBF szignifikáns időbeli változását igazolta (p<0,01**; az alap szakaszhoz képest). A B panel grafikonján szürke sáv jelöli a terjedő depolarizációk (SD) spontán kialakulásának helyét a MABP és a CBF változásához képest. Az SD-k túlnyomó többsége a hipovolémiás hipotenzio létrehozása közben, 4,6±0,8 perccel a vérlevétel kezdete után, 45±2 Hgmm-es MABP és 44±4 %-os CBF mellett jelentkezett (n=6). Az SD-k harmada a hipovolémiás hipotenzio kialakítását követően, a vérlevétel befejezés után 1,3±0,7 perccel, 34±4 Hgmm-es MABP és 43±15 %-os CBF mellett alakult ki (n=3).

A terjedő depolarizáció kiválthatósági körülményei globális előagyi iszkémiában

Az iszkémia során spontán jelentkező SD-eket az RH-1838 képsorokon azonosítottuk (5.3.2. ábra). Kilenc kísérletben az adatgyűjtési időszak alatt kísérletenként egy SD lépett be és haladt át a látótéren 2,8±0,2 mm/min terjedési sebességgel (5.3.2. ábra). Másik négy kísérletben nem láttunk az SD-re utaló optikai jelintenzitás-változást. Az SD hullámfrontja nyolc alkalommal a koponyaablak frontolaterális szélé felől (5.3.2. ábra), egy esetben kaudolaterális irányból érkezett a látótérbe, mely összhangban áll a szív-megállás és multifokális iszkémia modellben is tapasztalt, domináns, fronto-kaudális irányultsággal (4.2.2. és 5.2. fejezet). Az SD terjedő jellege arra enged következtetni, hogy bár a globális iszkémia az előagy minden területét egységesen érintette, az SD mégis egy jól körülhatárolható fókuszból indult, és terjedt tovább. Feltevésünket igazolja, hogy *ex vivo* agyszeleteken az SD pontszerű fókuszból ered a preparátumot térben és időben egységesen érintő oxigén-glükóz megvonás eredményeképp.¹⁹⁷ Ezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az egyenletesen hipoperfundált idegszövetben az iszkiára leginkább érzékeny sejtpopulációk depolarizálódnak először, kijelölve az SD fókuszt. Az előző fejezetben megállapítottuk, hogy az SD-k terjedési iránya alapján a hullám látótéren kívüli kiindulási pontja a striátum lehet (5.2. fejezet). A striátum neurokémiai és funkcionálisan kevert sejtcsoportjainak iszkiás toleranciája nagy változatosságot mutat,^{61,300} így elképzelhető, hogy a rágcsálóban előidézett globális előagyi iszkémia során a parietális kéregre ráterjedő SD-k valóban a striátumból erednek.^{392,401}



5.3.2. ábra. Terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) terjedésének multi-modális, képi megjelenítése globális előagyi iszkémia rágszáló modelljében. **A₁₋₅:** A feszültéggfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciájának SD-vel összefüggő intenzitás-változása. A reprezentatív esemény elhúzódo, tranzienst SD volt; a repolarizáció 13 perc elteltével zajlott le. **B₁₋₅:** Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) megjelenítése lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA). A hidegebb színek az alacsonyabb áramlású területeket jelölik. Az SD-hez csatoltan hipoperfúziót kaptunk. **C₁₋₅:** Az agyi térvolumen (CBV) jellemzése a visszaverődő fény intenzitása alapján (IOS) zöld megvilágítással mellett ($\lambda=540-550$ nm). A jelintenzitás növekedése a CBV csökkenésére enged következtetni. **D₁₋₅:** Piros IOS ($\lambda=620-640$ nm) felvételek a hemoglobin szaturációjának. A kísérlet kiaragdott szakaszában a hemoglobin teljes deszaturációja miatt a piros IOS a zöldhöz hasonlóan a CBV csökkenését tükrözte. A bal szélső, számozatlan felvételek (A, B, C, D) a látóteret mutatják be a négy modalitás tekintetében röviddel az RH-1838 inkubációt követően. Az 1-5 számozású RH-1838, CBF, zöld és piros IOS képsorozatát háttérkivonás, öt pontos mozgóátlag alkalmazása, és a kontraszt optimalizálása révén kaptuk. A CBF, zöld és piros IOS képeket szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. Az RH-1838 intenzitás-változását és a CBF dinamikáját a reprezentatív SD-re nézve az **5.3.3. ábra B panel** mutatja be.

Kísérleteinkben a 2VO és a hipovolémiás hipotenziókezdete között eltelt időben nem alakult ki SD, bizonyára azért, mert ebben az időszakban a CBF nem esett 65 ± 5 % alá, vagyis az iszkémia enyhe fokú volt. Az SD-t vagy a hipovolémiás hipotenzió létrehozása során, vagy a hipovolémiás hipotenzió kialakítását követően regisztráltuk, amikor a CBF 43 % körül mozgott (**5.3.1. ábra; 5.3.1. táblázat**). A 40-45 % körüli áramlás tehát a modellben az SD iszkémiás kiválthatósági küszöbeként azonosítható. Eredményeinket alátámasztja, hogy a fokális agyi iszkémiás patkány MCAO modelljében az SD CBF küszöbe 40 ml/100 g/min értékűnek bizonyult a megállapított 100 ml/100g/min alapáramláshoz képest.³⁷⁴ Kísérleteinkben az SD terjedése az agyi autoregulációs sáv elhagyásával is egybeesett, amely összecseng azzal a későbbi klinikai tanulmánnyal, amely zárt koponyasérült betegekben az autoreguláció zavarához szövetkárosító SD-eket társított.¹⁷⁶

Az SD-k három típusát határoztuk meg a depolarizáció hossza alapján (**5.3.1. táblázat**). Terminális depolarizációként definiáltuk az SD-t olyan esetben, amikor a látóterben repolarizáció

nem alakult ki a megfigyelési időszak alatt, és a szív megállást sem követte további SD (n=4) (5.3.3. ábra, A panel). Elhúzódó, tranzien SD-t akkor állapítottunk meg, amikor a repolarizáció ugyan lezajlott, de 5 percnél hosszabb ideig késlekedett (n=3) (5.3.3. ábra, B panel). Az angol nyelvű szakirodalom az ilyen jellegű eseményeket „köztes” (intermediate) SD-nek tekinti.⁹⁶ Az SD-t rövid, tranzien eseményként tartottuk számon, ha a repolarizáció 5 percnél belül jelentkezett (n=2) (5.3.3. ábra, C panel), bár az ép keringésű kéregben tapasztalt időtartamhoz képest (14-16 s) globális előagyi iszkémia alatt a rövid, tranzien SD-k is aránylag hosszan elhúzódtak (37±13 s). Az SD huzamosabb időtartama egyrészt jelezheti a szövet metabolikus krízisének növekvő súlyosságát, másrészt az SD szövetkárosító hatásának is fokmérője.⁹⁶

5.3.1. táblázat. A terjedő depolarizáció (spreading depolarization SD) típusai globális előagyi iszkémia rágcsláló modelljében

Értékelt jellemző	Az SD típusa			
	Rövid, tranzien (n=2)	Elhúzódó, tranzien (n=3)	Terminális (n=4)	Összes SD (n=9)
Az SD hossza (s/min)	36,5±12,5 s (n=2)	9,6±1,6* min (n=3)	Repolarizáció nincs (n=4)	N/A
MABP az SD megjelenésekor (Hgmm)	49,3 (n=1)	37,3±5,5 (n=2)	41,1±6,5 (n=3)	41,2±3,7 (n=6)
CBF az SD megjelenésekor (%)	40,6±4,6 (n=2)	37,8±11,5 (n=3)	49,1±7,3 (n=4)	43,4±4,9 (n=9)
Terjedési sebesség (mm/min)	2,37±0,48 (n=2)	3,20±0,37 (n=3)	2,70±0,32 (n=4)	2,79±0,22 (n=9)
A terjedés iránya	Frontolaterális → kaudomediális (n=8); kaudolaterális → frontomediális (n=1)			
SD kialakulása a szív megállás után	Igen	Igen	Nem	N/A
A CBF változás típusa	Nem egyértelmű	Tranzien áramláscsökkenés	Permanens áramláscsökkenés	N/A
A CBF változás mértéke (pp.)	N/A	-17,4±5,2 (n=3)	-11,7±5,1 (n=4)	N/A

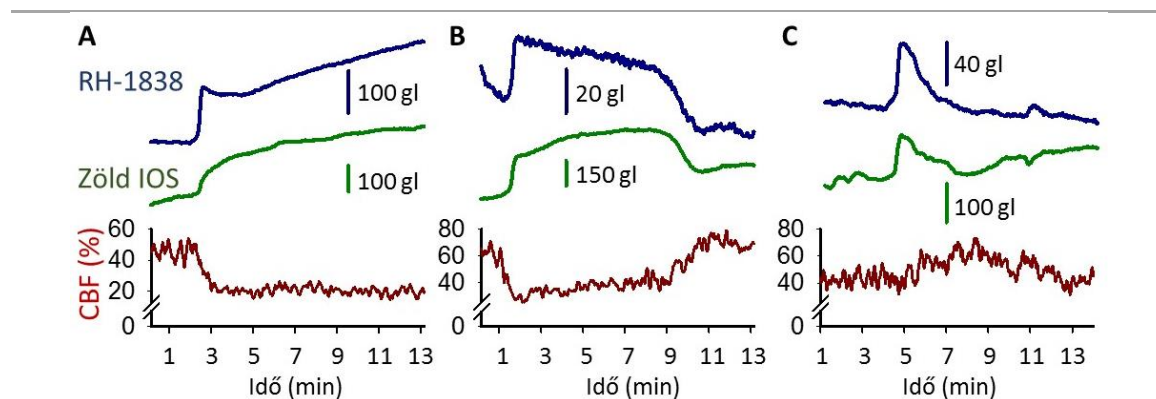
Az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg. A CBF változás százalékpontos csökkenését az RH-1838 SD-vel összefüggő intenzitás-fokozódásának maximumánál határoztuk meg. A statisztikai értékeléshez független T-próbát használtunk (p<0,05*; a rövid, tranzien SD-hez képest). Rövidítések: MABP: artériás közepnyomás (mean arterial blood pressure); N/A: nem értelmezhető.

A terjedő depolarizációval járó hemodinamikai válasz

Az SD eseményekhez zömében negatív áramlási választ, azaz terjedő iszkémiát kaptunk. Az SD-hez társuló CBF változás az SD típusa szerint eltérő mintázatot mutatott (5.3.3. ábra). A terminális depolarizációt permanens áramlasesés követte, mely a hipovolémiás hipotenzio kialakításával elért 40 % körüli hipoperfúziót még több, mint 10 %-al mélyítette (5.3.3. ábra A panel; 5.3.1. táblázat). Az elhúzódó, tranzien SD-ekkel hasonló nagyságrendű, de átmeneti, az SD hosszával arányos időtartamú áramláscsökkenés járt (5.3.3. ábra B panel; 5.3.1. táblázat). A zöld és piros IOS intenzitása a hipoperfúzióval szinkron fokozódott (zöld IOS: 15,7±1 pp., n=9; piros IOS: 4,5±0,6 pp., n=9), és az RH-1838 képsorokon látható SD-vel együtt terjedt (5.3.2. ábra). Figyelembe véve, hogy a hemoglobin mind a 2VO által okozott CBV eséssel, mind a hipovolémiával feltehetően teljes mértékben deszaturálódott,^{116,411} az SD-vel a zöld és a piros IOS intenzitás-növekedése is a CBV csökkenésére enged következtetni (4.2.2. fejezet). Az SD-hez csatolt hipoperfúziós válaszokat fokális előagyi iszkémia modellekben is tapasztaltak, bár az SD térbeli és időbeli lefutásához azokat nem tudták társítani.^{239,344,357} Saját kísérleteinkben az SD-hez társuló hirtelen áramlasesés az RH-1838 SD-t jelző meredek intenzitás-fokozódásának felet meg. Ez a jellemző időbeli egyezés a

terjedő iszkémia kialakulására utal^{96,101} (5.2.8. ábra, E-F panel), melyet vélhetően a vazodilatátor nitrogén-monoxid (NO) hiányában az extracelluláris térben vazokonstriktív koncentrációt elérő K⁺ hoz létre⁴¹³ (6.3. fejezet). Elhúzódó, tranzien SD-k esetén megfigyeltük, hogy a repolarizáció a CBF visszatérését követte. A jelenség azt a nézetet támasztja alá, hogy a perfúzió elégtelensége késlelteti a repolarizációt, így a rövid, tranzien SD elhúzódó, vagy terminális SD-vé alakul, ami veszélyezteti a szövet túlélését.⁹⁶

A rövid, tranzien SD-kkel egyértelmű CBF változás nem rajzolódott ki (5.3.3. ábra, C panel; 5.3.1. táblázat), mely emékeztet a multifokális előagyi iszkémia modellben leírt és tárgyalt hasonló eseményre (5.2. fejezet) (5.2.7. ábra).



5.3.3. ábra. A terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) társuló hemodinamikai válasz jellemzői globális előagyi iszkémia rágszáló modelljében. A reprezentatív kísérletekből származó, eredeti regisztrátumokon az SD megjelenését a feszültségfüggő festék (RH-1838) fluoreszcenciája igazolja (kék). A zöld visszaverődő fény (intrinsic optical signal, IOS) intenzitás-változása alatt (zöld) az agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz időbeli lefutása látható (sötét vörös). **A:** A terminális depolarizációval jellemzően permanens áramláscsökkenés járt. **B:** Az elhúzódó, tranzien SD-hez tranzien áramláscsökkenés társult. **C:** A rövid, tranzien SD-vel nem rajzolódott ki egyértelmű hemodinamikai válasz. Az RH-1838 és a zöld IOS regisztrátumokat öt pontos, a CBF görbékét kilenc pontos mozgóátlaggal simítottuk. Az RH-1838 és a piros IOS intenzitás-változását szürkeshint-változásként (gl) fejeztük ki.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Kutatásaink során bizonyítottuk, hogy az SD a globális iszkémiás sérülések kóreltani folyamataiban is szerephez jut. Eredményeink hiánypótlóak, hiszen az SD spontán kialakulását eddig csak az iszkémiás vagy traumás agysérülések fokális lézióhoz kötötték. Érdeemes tehát fontolóra venni az SD hozzájárulását a szisztémás keringés átmeneti megszűnésével, például a szívinfarktussal kapcsolatos neurológiai tünetek kialakulásához.

Vizsgálataink révén leírtuk és igazoltuk az SD-hez csatolt terjedő iszkémia jelenségét. Előző tanulmányaink tükrében megállapítható, hogy a terjedő iszkémia megjelenéséhez a kritikusan alacsony szöveti perfúzió teremt kedvező feltételeket. Másfelől a terjedő iszkémia tovább mélyíti a már fennálló hipoperfúziót, és növekvő időtartama késlelteti az SD-t követő repolarizációt. Mindezek alapján a terjedő iszkémia lényeges szerepet tölthet be az előagyi iszkémiával kapcsolatos neurodegeneratív kórfolyamatokban.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

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.

5.4. Az agykérgi terjedő depolarizációval járó szöveti acidózis: tranziens globális előagyi iszkémia és reperfúzió

Háttér

Az agyi metabolizmus intenzitásának becsléséhez leginkább a szöveti glukóz, laktát és piruvát koncentráció mérésére támaszkodnak, de a szöveti pH is hasznos támpontként szolgál. A szénhidrátok metabolizmusa során CO₂ és laktát képződik, amely hozzájárul az intersticiális folyadék savasodásához. A neuronok működésével továbbá erősen savas tartalmú szinaptikus vezikulák ürülnek az extracelluláris térbe, ami tovább csökkentheti az extracelluláris tér pH-ját. Az agyi interstícium kémhatásának savas irányú eltolódását a különböző puffer rendszerek – mint a szénsav-anhidráz enzim rendszer – ellensúlyozzák, valamint az intra- és extracelluláris tér közötti pH különbséget proton pumpák egyenlítik ki.⁵⁸

A hatékony pufferrendszerek ellenére a neuronális aktivitás fokozódása szinte késés nélkül átmeneti szöveti acidózist von maga után, így az idegszövet pH változásait a neuronális metabolizmus érzékeny indikátorának tekintik.⁵⁹ A súlyos mértékű acidózis ugyanakkor szövetkárosító hatású, mert módosítja az idegsejtek ingerelhetőségét, előmozdítja a szabadgyökök termelődését, gátolja az intracelluláris szignalizációs folyamatokat, és DNS-töredezést indukál.³⁴⁶ Az ép keringésű patkány agykéregben az SD alatt a szöveti pH átmenetileg 7,35-ről 6,90-6,95-re csökken (4.3. fejezet), ami mértékét és rövid időtartamát tekintve valószínűleg nem káros a neuronokra nézve. Azonban az SD-okozta pH változás a neuronok sérülése szempontjából meghatározó lehet, ha az SD az iszkémiás agykéregre jellemzően rövid időn belül többször ismétlődik, és az SD-vel járó acidózis hozzáadódik az iszkémiás penumbrát jellemző pH 6,9 körüli értékű acidózishoz.²³⁷ Kísérleteinket tehát az a hipotézis vezérelte, hogy az SD-re jellemző savas pH változás az iszkémiás agyban fellépő szöveti acidózist elmélyíti, és a szövetkárosító tartományba tolja el. Elképzelésünket alátámasztja, hogy az SD-t kísérő szöveti laktát-felhalmozódás iszkémia során jelentősebbnek bizonyult az ép agykéregben tapasztalható képest.³³⁵ Hipotézisünk igazolására patkány iszkémia modellben pH-szenzitív mikroelektrodát, és optikai, pH-alapú illetve CBF képalkotást alkalmaztunk (4.3. fejezet).

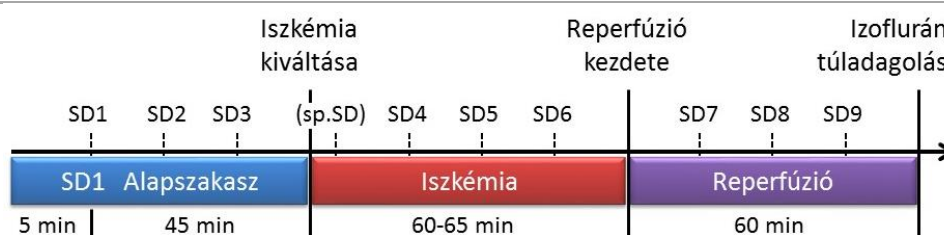
A kísérleti modell az eddig beállított iszkémia modellektől annyiban tért el, hogy az iszkémiára válaszolt kialakuló, spontán SD-ken túl kísérletesen további SD-eket is kiváltottunk. Az SD-k kontrollált kiváltásának előnye, hogy időzítésük kiszámítható, az események közötti változatosság minimális, és az ép agykéregben kiváltott SD-khez hasonlóan az iszkémiás SD-kre jellemző eltérések közvetlenül, megbízhatóan értékelhetők.

Módszerek

Kísérleteinket fiatal felnőtt (2 hónapos), hím, Sprague-Dawley patkányokon végeztük (n=20). A kísérleti állatok előkészítését, a pH-szenzitív mikroelektrodák alkalmazását, ezzel egyidejűleg a lézer-Doppleres áramlásmérést, és a szöveti pH-t és CBF változásokat monitorozó optikai képalkotó eljárást a 4.3. fejezetben részletesen ismertettük. A globális előagyi iszkémia kialakítására a CCA-t mindkét oldalon kipreparáltuk (5.3. fejezet), majd házilag készített műanyag okklúdereket fűztünk az erek köré, hogy az artériákat a kísérleti protokoll egy adott fázisában elzárjuk. Az állatok egy csoportjában az agykérgi pH változásokat ionszenzitív mikroelektrodával, egy másik csoportban pH alapú multi-modális képalkotással regisztráltuk (4.3. fejezet).

Ötven perces alapszakasz felvétele után a CCA-kat elzártuk (2VO), majd egy óra elteltével az érelzárás feloldásával reperfúziót hoztunk létre. A kísérleteket egy újabb óra elteltével izoflurán túladózásával fejeztük be. A kísérlet három fázisa során (alap, iszkémia, reperfúzió) egyenként 3-3 SD-t váltottunk ki 15 perces időközönként (4.3. fejezet) (5.4.1. ábra). A kísérletek egy részében a 2VO után percekben belül egy spontán SD is megjelent (5.4.1. ábra).

A részletes analízis során a spontán és kísérletesen kiváltott SD-eket külön értékeltük. A kísérletesen kiváltott eseményeket a kísérletek három szakasza szerint (alap, iszkémia, reperfúzió) hasonlítottuk össze, az első SD-t (SD1) elkülönítve. A kapott eredményeket átlag \pm stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). A statisztikai értékeléshez egyszempontos ANOVA-t használtunk, melyet Fisher post hoc teszt követett.



5.4.1. ábra. A kísérleti protokoll. A számozott terjedő depolarizációs események (spreading depolarization, SD) az 1 M KCl-al, kísérletesen kiváltott SD-eket jelölik. A kísérletek egy részében, az iszkémia indukciója után közvetlenül spontán SD (sp. SD) is kialakult, melyet bizonytalan megjelenése miatt zárójelben adtunk meg. A globális előagyi iszkémiát kétoldali *arteria carotis communis* elzárással (two-vessel occlusion, 2VO), a reperfúziót az érelzárás feloldásával hoztuk létre. A kísérleteket az altató túladagolásával fejeztük be.

Iszkémia alatt a terjedő depolarizációval markánsabb acidózis jár

Az ép kéregben lezajló SD-hez képest az iszkémia alatt kiváltott eseményekkel jelentősen határozottabb acidózis alakult ki, melyet jellemzett a nagyobb relatív amplitúdó ($0,43\pm 0,15$ vs. $0,36\pm 0,07$ pH egységnyi változás), a hosszabb fél amplitúdónál mért idő (pH-szenzitív mikroelektroda: $93,1\pm 26,3$ vs. $40,2\pm 8,1$ s; NR képalakítás: $127,5\pm 64,2$ vs. $39,8\pm 13,8$ s), és a kiterjedtebb görbe alatti terület (AUC, area under the curve) (pH-szenzitív mikroelektroda: 2415 ± 869 vs. 855 ± 322 pH egység x s) (5.4.2. ábra). Az iszkémiás agykéregben SD után lassult a szöveti pH rendeződése is, melyet az acidózis visszatérő szakaszának meredeksége adott meg (pH-szenzitív mikroelektroda: $0,44\pm 0,33$ vs. $0,70\pm 0,26$ pH egység/s). A reperfúzió fázisa alatt az SD-khez tárduló acidózis a kísérlet alapszakaszára jellemző mértékűnek bizonyult (relatív amplitúdó: $0,31\pm 0,09$ vs. $0,36\pm 0,07$ pH egységnyi változás; fél amplitúdónál mért idő: $42,0\pm 8,0$ vs. $40,2\pm 8,1$ s).

Korábbi megfigyelések azt valószínűsítik, hogy az SD-vel járó acidózis a laktát szöveti felhalmozódásával függ össze.^{267,332} Az SD során kialakuló laktát-acidózis valószínűségét támasztja alá az is, hogy agyi iszkémia során az idegszöveti pH csökkenése egyenesen arányos a laktát felszaporodásával.^{198,283} Ezek alapján tehát azt feltételezzük, hogy az iszkémiás kéregben az SD-vel azért alakul ki markánsabb acidózis az ép kéreghez képest, mert az SD iszkémia alatt nagyobb mértékben fokozza a laktát felszaporodását. Az iszkémia alatti jelentősebb laktát termelődés mögött az állhat, hogy az SD a sérült szövetben kizárólag anaerob metabolizmust indít be,²⁸¹ míg az ép kéregben az SD-okozta metabolikus igényt kezdetben a glükóz aerob, majd később anaerob lebontása fedezi.^{253,316}

A terjedő depolarizációt követő hiperémia mértéke csökken iszkémia során

A kísérleti modell a látótérben (de globális természeténél fogva valószínűleg a teljes agykéregben) az iszkémiás penumbrára jellemző viszonyokat teremtett. Az érelzárás után a CBF 20-40 % között mozgott a reperfúzió megkezdéséig, mely megfelel az iszkémiás penumbra szöveti perfúziót alapul vevő definíciójának.¹⁰ Eredményeink értékelése szempontjából a penumbrára jellemző viszonyok vizsgálata nagy jelentőséggel bír, hiszen fokális iszkémiában az ismétlődő SD-k elsősorban a penumbrára nézve károsak.¹⁶⁴

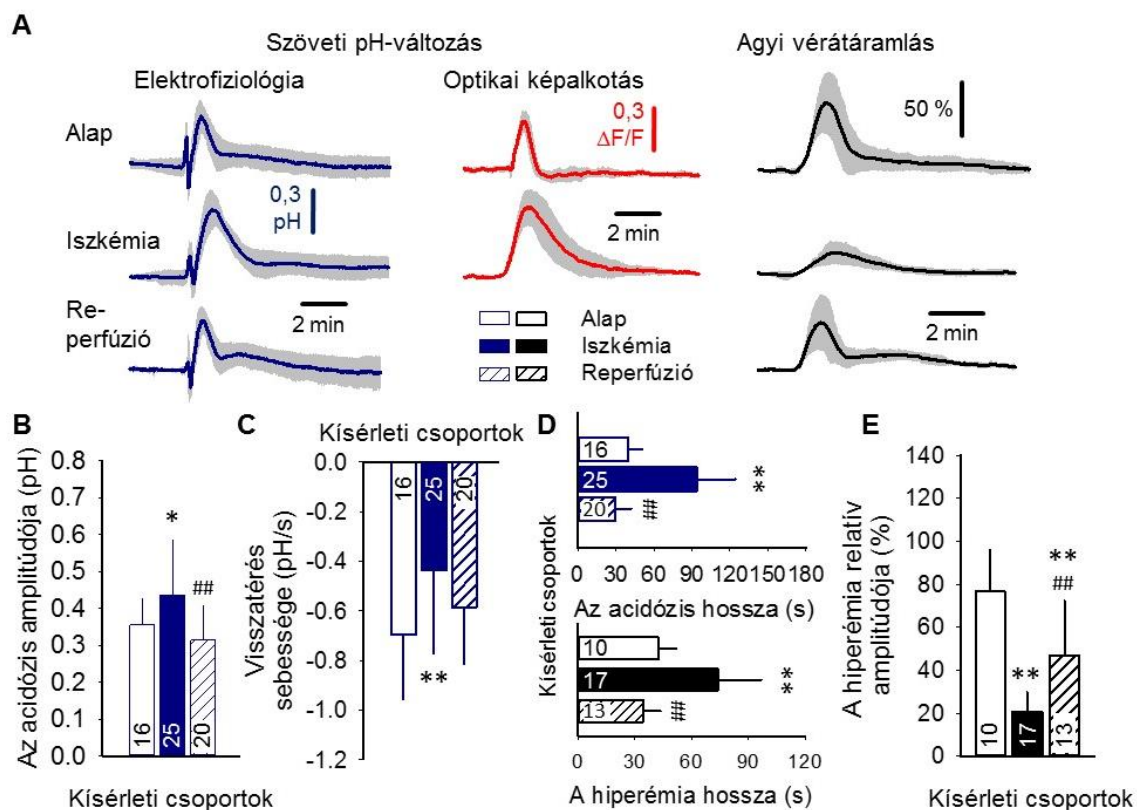
A kiváltott SD eseményekhez az esetek döntő többségében hiperémia társult (**5.4.2. ábra**). A kísérletek iszkémiás szakaszában elvértve terjedő iszkémiát is megfigyeltünk, de a terjedő iszkémia alacsony előfordulási gyakorisága miatt ezeket statisztikailag nem értékeltük. A hiperémiás válaszok meghatározó előfordulását okozhatta, hogy az iszkémiás inzultust megelőző alap szakaszban SD-ket váltottunk ki. Az ép kéregben indukált SD-t ugyanis prekondicionáló stimulusként is számon tartják, mely növeli az iszkémiával szembeni toleranciát.³⁴¹ Elképzelhető, hogy az iszkémia súlyosabb következményekkel járt volna, ha nem előzi meg ismételt SD kiváltás.

Az SD-vel összefüggő hiperémia kezdete az acidózis kezdetét $24,5 \pm 23,5$ s késéssel követte. Az iszkémia során az SD-vel járó hiperémia relatív amplitúdója jelentősen csökkent ($20,8 \pm 8,9$ vs. $76,3 \pm 119,6$ %), hossza pedig megkétszereződött az alap szakaszhoz képest ($146,4 \pm 49,7$ vs. $61,4 \pm 11,6$ s) (**5.4.2. ábra**), mely megfelel korábbi megfigyeléseknek.¹³³ A hiperémia AUC-je iszkémia alatt kisebbnek bizonyult (3009 ± 1073 vs. 4428 ± 1436 % x s). A hiperémia csökkenését iszkémia alatt okozhatta a neurovaszkuláris csatolás sérülése.¹⁹⁶ Ugyanakkor az iszkémia akut szakaszában a perfúzió csökkenését metabolikus vazodilatátorok, például adenzin vagy laktát gyors felszabdulása, illetve az ADP/ATP arány emelkedése követi, mely az agyi arteriolák tágulásához vezet.⁶⁵ Ebből következik, hogy az erek alaptónusának csökkenése miatt a további vazodilatáció tartománya beszűkül, mely magyarázhatja az SD-re válaszul kialakuló hiperémia kisebb amplitúdóját az iszkémiás kéregben.

A reperfúzió fázisában a hiperémia jellemzői javultak az iszkémiás szakaszhoz képest, de relatív amplitúdója és AUC-je nem rendeződött az alap szakaszra jellemző értékre (relatív amplitúdó: $46,9 \pm 25,3$ vs. $20,8 \pm 8,9$ vs. $76,3 \pm 119,6$ %; AUC: 2788 ± 1362 vs. 3009 ± 1073 vs. 4428 ± 1436 % x s; reperfúzió vs. iszkémia vs. alap szakasz). Ez megfelel a neurovaszkuláris csatolás részlegesen fennmaradó elégtelenségének MCAO-t követő reperfúzió alatt.³⁶⁶ A reperfúzió korai szakaszában a depolarizációval összefüggő hiperémia részleges helyreállításának hátterében a periciták elhúzódnak, és a kapillárisok gyenge átjárhatósága állhat.^{152,420}

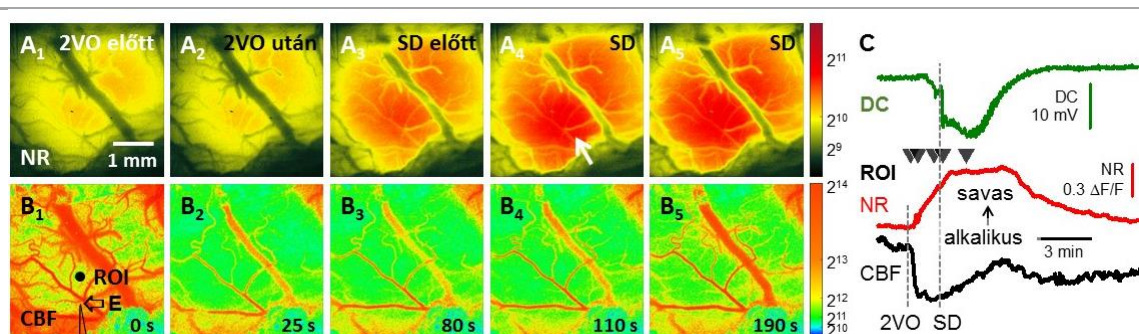
A terjedő depolarizáció jelentősen elmélyíti az iszkémia-okozta idegszöveti acidózist

Kísérleteinkben az iszkémia kialakítását követően a szöveti pH átlagban $6,93 \pm 0,09$ -nek adódott, hasonlóan ahhoz a tartományhoz (i.e. pH 6,9-7,0), amit korábban kísérletes MCAO után a penumbra régióra kalkuláltak.²⁹⁰ A kísérletek egy részében, az iszkémia kialakítását követő két percben spontán SD jelentkezett. A felvett képsorok tanúsága szerint – a korábbi fejezetekben bemutatott megfigyelésekkel egyezően – az esemény frontolaterális (a később kísérletesen kiváltott SD-k kiindulási pontjával ellentétes) irányból lépett be a látótérbe (**5.4.3. ábra**). Az SD spontán megjelenésének kedvezett, ha az iszkémia indukciója után a CBF minimumértéke 20 % alá esett, illetve ha a szöveti pH iszkémiával összefüggő csökkenése a 0,2 pH egységnyi mértéket meghaladta (**5.4.4. ábra**). Érdekes módon az iszkémia indukcióját megelőző szöveti pH alkalotikusabb volt azokban az esetekben, amikor az iszkémia kezdetén spontán SD jelent meg, ahhoz képest, amikor spontán SD-t nem tapasztaltunk (pH $7,28 \pm 0,06$ vs. $7,21 \pm 0,04$; spontán SD megjelenése vs. elmaradása).



5.4.2. ábra. A kísérletesen kiváltott terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD) járó szöveti acidózis és agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz patkány agykéregben. **A:** Az SD-vel járó szöveti pH-változás (kék és piros) és CBF változás (fekete) a kísérlet három szakaszára lebontva (i.e. alap, iszkémia, reperfúzió). A vonaldiagramokat számos kísérletből származó SD-k átlagaként ábrázoltuk (átlag \pm stdev; n=6/8). A kék a pH-szenzitív mikroelektrodák révén, a piros a pH-alapú optikai képalkotás eredményeként kapott pH változásokat tünteti fel. A pH-alapú optikai képalkotással a reperfúzió szakaszról nem nyertünk megbízható adatokat a neutrálvörös (Neutral Red, NR) fakulása miatt. A feltüntetett CBF változásokat lézer-Doppleres áramlásméréssel regisztráltuk. **B:** Az acidózis relatív amplitúdóját pH egységnyi változásként adtuk meg. **C:** A visszatérés sebessége az acidózisból. **D:** Az acidózis és a hiperémia fél amplitúdónál mért időtartama. **E:** A hiperémia relatív amplitúdója. A B-E paneleken az adatokat átlag \pm stdev formában adtuk meg, az elemszámokat az oszlopokon tüntettük fel. A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$), melyet Fisher post hoc teszt követett ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$ vs. alap szakasz; $p < 0,01^{##}$ vs. iszkémia).

A spontán SD a savas szöveti pH viszonyokat jelentős mértékben súlyosbította. Az iszkémiával összefüggő szöveti acidózishoz az SD-okozta acidózis hozzáadódott. A spontán SD a szöveti pH-t átlagban $6,93 \pm 0,09$ -ról átmenetileg $6,48 \pm 0,16$ -ra tolta el (5.4.4. ábra), mely fokális inzultus esetén inkább az iszkémiás mag régióra jellemző érték. Összehasonlításképpen, a nyúl agykéregben kialakított fokális iszkémia a szöveti pH-t $6,64$ -re csökkentette;²⁵⁸ patkány MCAO modellben az infarktus peremén a szöveti pH $6,53$ -nek adódott.¹⁹ Mindezeket figyelembe véve feltételezzük, hogy az SD az iszkémiás penumbra végighaladva a szöveti pH-t átmenetileg az iszkémia mag régiójára jellemző, erősen savas tartományba tolja el, ami egy potens, neurodegeneráció eredményező kórfolyamat.

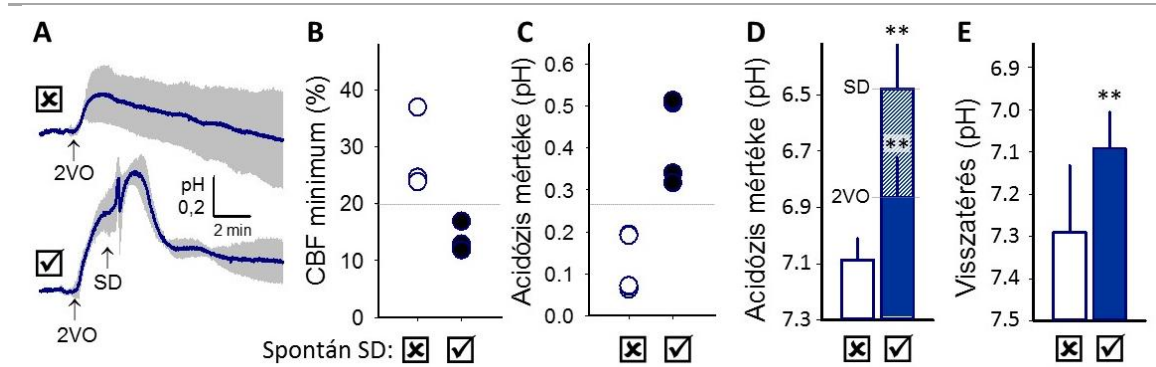


5.4.3. ábra. A nyers neutrálrvörös (Neutral Red, NR) és lokális agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) képsorok, azok egy meghatározott pontjából (region of interest, ROI) nyert intenzitásgörbék, és a beültetett elektródával elvezetett DC potenciál az iszkémia indukcióját és egy spontán terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) áthaladását szemléltetik a látótéren. **A:** A reprezentatív felvételeken a szöveti acidózist az NR fluoreszcencia-intenzitásának emelkedése (melegebb színárnyalat) jelöli. A spontán SD belépését a látótérbe fehér nyíl (A₄) szemlélteti. **B:** A lézér-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA) számított áramlási térképek az iszkémia indukciójával (kétoldali *arteria carotis communis* elzárás, two-vessel occlusion; 2VO) okozott áramlásesést, és az SD-vel járó CBF változást jelenítik meg. A sorozat képein a melegebb színek a magasabb áramlási viszonyoknak felelnek meg. A monokróm kamerák által készített 16 bites fekete-fehér felvételeket az A és B sorozaton szoftveresen pseudo-color alkalmazásával színeztük. A képsoroktól jobbra feltüntetett színskálák a színezéshez felhasznált szürke sáv tartományt jelölik. **C:** Az idősorok az NR fluoreszcencia-intenzitásának (piros) és a CBF (fekete) iszkémiával és SD-vel összefüggő változásait mutatják. Az SD kialakulását a DC potenciál tranziens, negatív kitérése igazolta (zöld). Az NR intenzitásgörbék felett sorban lefelé mutató fekete háromszögek az A és B paneleken látható felvételpárok időbeli mintavételi helyét jelölik. A megjelenített változásokat a B₁ felvételen megadott ROI, és az elektrofiziológiai változók elvezetésére beültetett mikroelektróda (E) segítségével jelenítettük meg.

A spontán SD után 10 perccel a szöveti pH savasabban maradt azokhoz a kísérletekhez képest, amelyekben az iszkémia előidézése után spontán SD nem jelentkezett (pH $7,09 \pm 0,09$ vs. $7,29 \pm 0,16$); utóbbi esetben 10 perc elteltével a szöveti pH az iszkémiát megelőző értékre tért vissza, azaz teljes mértékben rendeződött. Hosszú távon az SD után fennmaradó, enyhébb fokú acidózis is sejtkárosító lehet, hiszen az acidózis-indukálta sejtkárosodás küszöbe az acidózis fennállásának hosszával arányosan csökken.²⁷² Tekintve, hogy az iszkémiás kéregben az SD-k visszatérő mintázatban ismétlődnek,^{184,270} és eredményeink szerint a szöveti pH az SD után legalább 10 percig savas tartományban marad, az SD a szöveti acidózis fenntartása révén is növelheti a neuronkárosodás kockázatát.

Az uralkodó hipotézis szerint az SD-okozta idegszöveti sérülés oka, hogy a csatolt CBF változásban a hipoperfúzió domináns szerephez jut, terjedő iszkémia alakul ki, amely mélyíti a szövetben fennálló perfúziós deficitet.^{96,164} Azonban az iszkémiás penumbra áthaladó SD-knek csak egy kis hányadához társul terjedő iszkémia. Az itt bemutatott kísérletek tanúsága szerint is az események többségét hiperémia kíséri. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy bár az SD-vel járó hiperémia mértéke iszkémiás szövetben csökken, és valószínűleg nem elégíti ki teljes mértékben a szövet metabolikus igényeit, a szöveti pH csökkenése meghatározó módon járulhat hozzá az SD-vel kapcsolatos neurodegenerációhoz.

Ismert, hogy a szöveti acidózis az iszkémiás sérüléseket súlyosbítja, valamint hogy az iszkémiás idegsejt-károsodás mértéke a szöveti acidózissal arányos.³⁴⁵ A bemutatott kísérletek alapján megállapítható, hogy az SD az iszkémia során fellépő szöveti acidózist huzamos ideig fenntartja, átmeneti időszakokra jelentősen elmélyíti, és a szöveti pH rendeződését gátolja. Eredményeink alapján tehát azt feltételezzük, hogy az SD szövetkárosító hatása részben az acidózis révén érvényesül.



5.4.4. ábra. A szöveti acidózis időbeli mintázata az iszkémiával és a spontán megjelenő terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD). **A:** A vonaldiagramokat számos kísérletről származó felvételek átlagaként ábrázoltuk (átlag±stdev). A kísérleteket két csoportra osztottuk aszerint, hogy az iszkémia indukciója (kétoldali *arteria carotis communis* elzárás, two-vessel occlusion; 2VO) utáni percekben jelentkezett-e spontán SD (☑) vagy sem (☒). **B:** A CBF legalacsonyabb értéke közvetlenül az iszkémia indukciója után. **C:** Az iszkémiával összefüggő szöveti acidózis relatív mértéke közvetlenül a spontán SD megjelenése előtt. A B-C paneleken az egyes kísérleteket egy-egy szimbólum jelzi. A vízszintes, szaggatott vonal a spontán SD kialakulásának elméleti küszöbértékét szemlélteti. **D:** A szöveti acidózis mértéke. A kék oszlop teljes kitöltéssel az SD-t közvetlenül megelőző pH értéket tünteti fel (2VO), a teljes, kiegészített oszlopmagasság az SD-okozta pH változást is hozzáadja. **E:** Szöveti pH 12 perccel az SD-t követően. A D-E paneleken az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,01^{**}$ vs. iszkémia spontán SD nélkül).

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Kóros körülmények között először mutattuk meg és fejeztük ki az SD-hez társuló szöveti acidózis jellemzőit. Rávilágítottunk arra, hogy az SD-vel járó acidózis mértéke függ az idegszövet metabolikus állapotától, így iszkémia alatt a pH csökkenés jóval kifejezettebb, mint optimális szöveti perfúzió mellett. Bizonyítottuk, hogy az iszkémia okán fellépő, enyhébb acidózishoz hozzáadódik az SD-hez társuló, határozottabb pH csökkenés, mely arra enged következtetni, hogy az SD-okozta neuronpusztulás a szöveti acidózissal összefügg. Eredményeink abba az irányba mutatnak előre, hogy az extracelluláris tér pufferkapacitásának növelése vagy a laktát hatékonyabb eltávolítása eredményes neuroprotektív stratégiának bizonyulhat.

Módszertani előrelépés, hogy a pH-alapú képalkotás révén térben is követni tudtuk az idegszövet SD-vel összefüggő pH változásait. A felvételek analízise során azonban még nem aknáztuk ki a módszerben rejlő összes lehetőséget. Az 5.2. fejezetben bemutatott, a CBF területi megoszlását jellemző teljes kép analízishez hasonlóan például jellemezni lehetne a feltárt agykérgi felszínen a szöveti pH változásának térbeli megoszlását is.

Eredményeink hasznosíthatósága szempontjából a következő megállapítás tehető. A klinikumban az SD-k neurodegenratív hatását az ismétlődő események elektrokortikogramon értékelhető kumulatív időtartamával hozzák összefüggésbe.^{96,108} Megfigyeléseink szerint a szöveti pH SD-vel kapcsolatos változásai az iszkémiás sérülés érzékeny indikátorának tekinthetők. Ezek alapján az idegsebészeti intenzív osztályon alkalmazott laktát bioszenzor^{181,288} alkalmas lehet a szöveti acidózis indirekt követésére, és az SD-okozta sérülés prognózisára.

Végül a szöveti pH csökkenése kihasználható a sérült területre korlátozódó gyógyszerhatóanyag-bejuttatásra iszkémiás sérülések esetén. Jelenleg futó kísérleteink azt vizsgálják, hogy savas pH-ra nyíló, az értágító nimodipint (L-típusú feszültség-függő Ca^{2+} csatorna blokkoló) szállító nanopartikulumok milyen hatékonysággal adják le a hatóanyagot és érnek el védő hatást az agyi iszkémia állatmodelljében. A szöveti pH alapján az iszkémiás szövetregióra

leszűkített kezelések révén elkerülhetőek lennének a hatóanyagok nem kívánatos, szisztémás mellékhatásai.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Orsolya MT, Szepes BÉ, Tóth R, Ivánkovits-Kiss O, Obrenovitch TP, Bari F, **Farkas E**. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep*. 2017;7(1):1154.

6. Az agykérgi terjedő depolarizációhoz csatolt agyi vérátáramlási változás mediátorai, az agyi iszkémia hatása

A szakmai közvélemény szerint az SD-hez társuló CBF változást – a szomatoszenzoros ingerlésre kialakuló funkcionális hiperémiához hasonlóan – neurovaszkuláris csatolás szabályozza.¹⁶ Bár az SD-vel kialakuló áramlási válaszban valóban megjelenik egy markáns, hiperémiás komponens, ennek mértéke jóval meghaladja a szomatoszenzoros ingerlésre adott funkcionális hiperémiát (6.0.1. táblázat). Az SD-hez csatolt áramlási válasz továbbá több komponensű, jellegzetes lefutású, amely alapvetően különbözik a neuronális aktivitással együtt járó, klasszikus funkcionális hiperémiától.¹⁶ Végül az SD-hez csatolt CBF változást követően az agyi érhálózat reaktivitása egyes potens stimulusokra (pl. CO₂) átmenetileg (akár 60 percig is) szünetel,^{200,223} míg a funkcionális hiperémia lecsengését követően megtartott marad (6.0.1. táblázat).

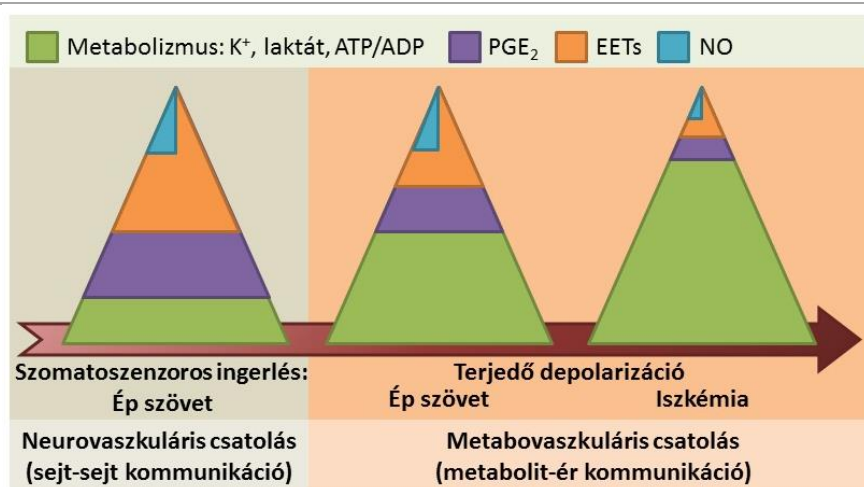
6.0.1. táblázat. Jellemzők, melyek a szomatoszenzoros ingerlésre és a terjedő depolarizációra válaszul kialakuló hiperémiát rágszáló modellekben megkülönböztetik.

Jellemző	Bajuszingerlés	Terjedő depolarizáció*
A hiperémia relatív amplitúdója a 100 % alaphoz képest	10-30 pp.	40-120 pp.
A CBF visszatérése	Alapértékre	5-20 pp.-vel az alapérték alá
Az agyi erek CO ₂ reaktivitása az eseményt követően	Megtartott	Átmenetileg kiesik
További szomatoszenzoros ingerlésre adott CBF válasz	Kialakul	Nem alakul ki
A vazodilatáció mediátorai	NO, PGs, EETs	Nincs megegyezés

*Ismételten kiváltott események közül az elsöre vonatkozik. Rövidítések: CBF: agyi vérátáramlás (cerebral blood flow); EETs, epoxieikozatriénsavak (epoxyeicosatrienoic acids); NO, nitrogén-monoxid; PGE₂: prosztaglandin E₂.

A neurovaszkuláris csatolás mediátorainak (e.g. nitrogén-monoxid, prosztaglandin E₂, vagy az epoxieikozatriénsavak)^{11,42,187} szerepét az SD-vel együtt járó CBF válaszreakció kialakításában sokan és régóta kutatják, de máig nem sikerült a hiperémiát egy meghatározó vazodilatátor hírvívő felszabadulásával egyértelmű összefüggésbe hozni.¹⁶ Munkánk során újra gondoltunk és újra megvizsgáltunk egy túlhaladottnak tartott elképzelést, mely szerint az SD-t követő véráramlásfokozódás a „feed-forward” módban szabályozott funkcionális hiperémia helyett egy „feed-back” alapon létrejövő reaktív hiperémia.²²⁴ Álláspontunk szerint az SD során nem jellemző

a funkcionális hiperémiához vezető neuronális aktivitás-fokozódás – épp ellenkezőleg, az idegszövet ingerelhetősége lokálisan percekig gátolt („spreading depression of activity”).²²⁷ Míg neuronális aktivációra az áramlás-fokozódás másodperceken belül eléri csúcspontját,²⁷⁷ az SD után 20-30 másodperc is eltelik a teljes hiperémia kialakulásáig (4.2. fejezet). Végül figyelembe kell venni azt a körülményt, hogy az SD-hez csatolt hiperémiát áramlásesés előzi meg (a reaktív hiperémia létrejöttének előfeltétele¹⁴⁵), mely átmeneti hipoxiás állapotot is előidézhet az érintett területen.³⁷² Hipotézisünk szerint tehát az SD-vel járó CBF változás reaktív hiperémia, és metabovaszkuláris csatolás eredményeképpen jön létre, melyben szerep juthat a laktát fokozott termelődése révén a szöveti acidózisnak (5.4. fejezet), illetve az SD során drasztikus mértékben felszaporodó intersticiális káliumnak^{351,404} (6.0.1. ábra). A laktát felhalmozódása neuronális aktivitás során bizonyítottan értágító hatású,^{11,144} míg a kálium extracelluláris koncentrációja 20 mM alatt vazodilatációt, 20 mM felett vazokonstriktiót indukál az agyban.²¹⁵



6.0.1. ábra. Vazoaktív mediátorok feltételezett hozzájárulása a terjedő depolarizációt követő agyi vérátáramlási válasz kialakításához. Rövidítések: EETs: epoxieikozatriénsavak; NO: nitrogén-monoxid; PGE₂: prosztaglandin E₂.

Az alábbiakban bemutatott munkánk során tehát célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, mekkora a részesedése a neurovaszkuláris csatolásban fontos szerepet játszó vazodilatátor prosztaglandinoknak (PGs) az SD-t követő hiperémia kialakításában. Összefüggéseket kerestünk továbbá a szöveti pH és az intersticiális kálium koncentráció-változásai és az SD-hez csatolt CBF változások között. Mivel kutatásaink központi témája az agyi iszkémia, és insert, hogy iszkémia során a klasszikus neurovaszkuláris csatolás sérül,¹⁹⁶ arra is választ kerestünk, hogy az iszkémiás állapot az SD-t követő véráramlási válasz szabályozását miként módosítja.

6.1. Az értágító prosztaglandionok szerepe

Háttér

Az SD-hez társuló CBF változás szabályozása meglehetősen összetett folyamat, így vélhetően nem is köthető egy adott, specifikus mediátorhoz.¹⁶ A somatoszenzoros ingerléssel kiváltott klasszikus neurovaszkuláris csatolás mediátorai között tartják számon a prosztaglandionokat, melyek potens vazoaktív metabolitok.^{11,42} Az értágító prosztaglandinok szintézisében meghatározó szerepet tölt be az indukálható ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim, melynek az arachidonsav a szubsztrátja. A COX-2-t az agykéregben elsősorban a piramisisejtek expresszálják,²¹⁶ és megtalálható a kérgi penetráló arteriolák és kapillárisok mentén a

perivaszkuláris idegvégződéseiben is.⁴⁰⁶ Értőnust szabályozó szerepét tekintve lényeges, hogy a COX-2 – termékeinek révén – bizonyítottan részt vesz a szomatoszenzoros ingerlésre adott funkcionális hiperémia kialakításában.^{42,277} Vazoaktív COX-2 származék a prosztaglandin E₂ (PGE₂), melyet a COX-2 termékeket tovább alakító prosztaglandin E szintáz (PGES) állít elő.²⁸⁶ A PGE₂ az agyi erek falában is azonosított 2-es és 4-es típusú PGE₂ receptorokhoz kötődve (EP₂ és EP₄) vált ki vazodilatációt, és részt vesz a funkcionális hiperémia kialakításában.^{42,216,406}

A COX-2 enzimátikus útvonallal ellentétben a konstitutív COX-1 enzim szerepe a neurovaszkuláris csatolásban nem világos.¹⁸⁷ A COX-1 szelektív gátlása egyrészt szaglási ingerre, vagy a perivaszkuláris asztrocita végtalpokban kísérletesen megnövelt Ca²⁺ koncentrációra válaszul megakadályozta a hiperémia kialakulását,^{293,371} ugyanakkor a rágcsáló bajuszingerléses modellben nem védte ki a neuronális aktivitásra bekövetkező áramlásnövekedést.^{229,278,315}

Az SD-hez kapcsolódó CBF változás kialakításában joggal feltételezhető az arachidonsav-metabolitok szerepe, hiszen az SD során az agykéregben jelentős az arachidonsav felszaporodása,²²⁶ és a cerebrospinális folyadékban visszamérhető a prosztanoidok, köztük az PGE₂ szignifikánsan megemelkedett szintje.³⁴³ Azonban a prosztaglandinok szomatoszenzoros ingerlésre adott értágító hatásával szemben⁴² az SD során felszabaduló arachidonsav-termékek erősszehúzó hatásának bizonyultak, így például a COX enzimek indometacin kezelés révén elért, nem-szelektív gátlása az SD-re válaszul a piális arteriolák fokozott tágulatát okozta.³⁴³ Más kísérletek tanúsága szerint az SD a cerebrovaszkuláris simaizomsejtekben serkenti a vazokonstriktív hatással bíró 20-HETE szintézisét, és a 20-HETE termelésének gátlása enyhíti az SD során kialakuló CBF változás oligémiás komponensét.¹³⁴ A COX-1 és a COX-2 enzim szelektív gátlásának hatását az SD-t kísérő CBF változás dinamikájára nem ismerjük, bár a COX-2 szerepe a jelátvitelben valószínűsíthető, hiszen az enzimet kódoló mRNS átírása és maga a fehérje transzlációja is fokozódik az SD-vel összefüggésben.²⁶¹

A COX-2 által katalizált jelátvitel az SD-hez társuló CBF válaszreakcióban különösen releváns lehet agyi iszkémia során, hiszen iszkémia alatt a COX-2 kifejeződése nagymértékben növekszik, még hozzá abban az időszakban, amikor spontán SD-k alakulnak ki.^{36,279} Megfigyelték továbbá iszkémia alatt az EP₄ receptorok expressziójának növekedését,²³⁴ melyek a COX enzimátikus útvonalon keresztül képződő PGE₂ bekötődésére vazodilatációs jelátvitelt indítanak be.^{42,216,406}

Összefoglalva, bár a COX-2 enzimátikus útvonal szerepét a szomatoszenzoros stimulálással járó funkcionális hiperémia kialakításában széles körben elismerik,^{11,42} az eddigi SD-vel kapcsolatos eredmények nagyon szerteágazóak, ellentmondásosak, és nehezen értelmezhetőek.¹⁶ Kutatásunk során választ kerestünk arra, hogy a COX-1 és COX-2 enzimátikus útvonal, illetve az EP₄ receptor milyen mértékben járul hozzá az SD-vel kapcsolatos hiperémia kialakításához az intakt agykéregben, és iszkémiás körülmények között. Kérdésünk megválaszolására a COX-1 és a COX-2 enzimeket szelektíven, farmakológiai módszerekkel gátoltuk, így csökkentettük többek között a vazodilatátor PGE₂ szintézisét, valamint blokkoltuk a PGE₂ EP₄ receptorát.

Vizsgálataink arra is kiterjedtek, hogy megállapítsák a COX-1 és a COX-2 enzimek által termelt metabolitok, illetve az EP₄ receptor szerepét az SD kialakulásában. Célkitűzésünk azért is időszerű volt, mert az agyi iszkémiában hangsúlyozottan kifejeződő COX-2 útvonalon keresztül jelentős mennyiségű PGE₂-t termelődik. A PGE₂ többek között csökkenti az idegsejtek ingerelhetőségét,⁴¹⁹ és az iszkémiás sérülés súlyosbodásában a COX-2 – EP₄ receptor jelátviteli útnak is szerepet tulajdonítanak.^{8,234}

Módszerek

Kísérleteinket fiatal felnőtt (2 hónapos), hím, Sprague-Dawley patkányokon végeztük (n=60). A kísérleti állatok előkészítése, a koponyaablakok kialakítása (**4.3.1. ábra**), a globális előagyi iszkémiás indukciója (n=32), illetve az áloperált, iszkémiára nézve intakt kontroll csoport létrehozása (n=28)

egyezett a fentebb leírtakkal (4.3. és 5.4. fejezet). Az iszkémia indukciója után 15 perces időközönként négy SD-t váltottunk ki (5.4. fejezet). Az elektrofiziológiai jelet (a DC potenciál változása) és a lokális CBF változásokat a már részletezett módon rögzítettük (4.3. fejezet).

A farmakológiai kezeléseket a rostrális koponyaablakban végeztük. Az enzimgátlót vagy receptor blokkolót tartalmazó oldatokat, illetve a kontrollként használt oldószert (aCSF-ben 1,5 % dimetil-szulfoxid, DMSO) azonos volumenben a *dura mater* eltávolítása után közvetlenül az agyfelszínre mostuk (6.1.1. táblázat). A kezeléseket megelőzően referenciának 5 percig rögzítettük a DC potenciált és a CBF alapvonalát aCSF topikális rámosása mellett. A használt anyagok koncentrációját publikált dózis-hatás görbék, a szelektivitás és a hatékonyság adatai alapján választottuk.^{152,216,268,277,278} A következő farmakonokat használtuk: a szelektív COX-2 gátló NS-398-at²⁷⁷ (100 μ M; Cayman); a szelektív COX-1 gátló SC-560-at²⁷⁸ (25 μ M; Cayman); és az EP₄ antagonistát L161,982-t^{152,216} (1 μ M; Sigma) (6.1.1. táblázat). Az oldatokat 40 perccel az iszkémia indukciója, vagy az áloperált csoport esetén az első SD kiváltása előtt mostuk az agykéregre,²⁷⁷ és az inkubációt a kísérleti protokoll befejezéséig fenntartottuk.

A kapott eredményeket $\bar{x} \pm \text{stdev}$ formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). Az eredmények értékelését kétszemponos ANOVA-val végeztük, melyet szignifikáns eltérés esetén Fisher post hoc teszt követett.

6.1.1. táblázat. A kísérleti csoportok áttekintése.

Kísérleti csoport	Kezelés	Iszkémia indukció	n
1	Oldószer (1,5 % DMSO aCSF-ben)	SHAM	8
2		2VO	7
3	100 μ M NS-398 (COX-2 gátlás)	SHAM	7
4		2VO	6
5	25 μ M SC-560 (COX-1 gátlás)	SHAM	7
6		2VO	7
7	1 μ M L161,982 (EP ₄ receptor blokkolás)	SHAM	6
8		2VO	12

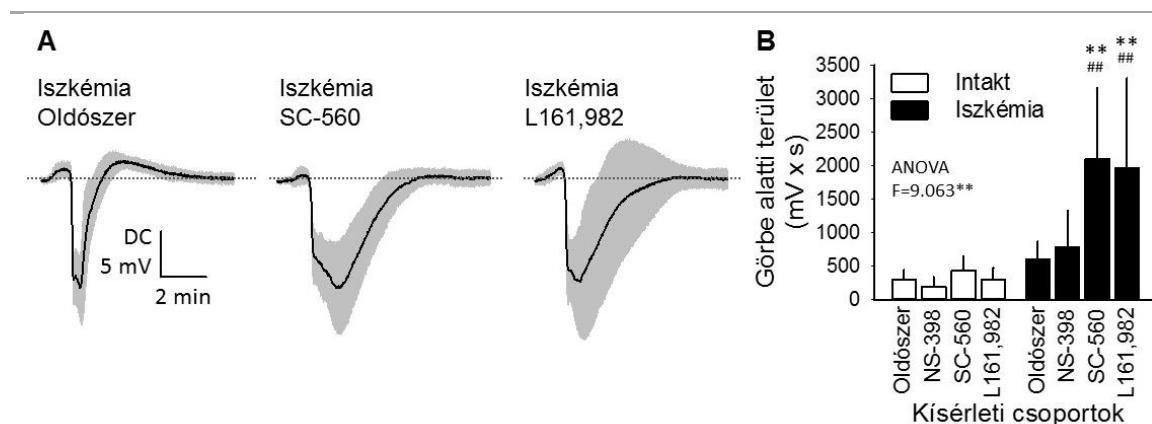
Rövidítések: 2VO: kétoldali *arteria carotis communis* elzárás (two-vessel occlusion); COX: ciklooxygenáz enzim; DMSO: dimetil-szulfoxid; EP₄: 4-es típusú prosztaglandin E₂ receptor; SHAM: áloperált.

A prosztaglandinok hatása a terjedő depolarizációra

Bár a kutatást vezérlő problémafelvetés az SD-hez csatolt CBF változás szabályozásából indult ki, az eredmények sorában a kezeléseket hatásukat először az SD, azaz a primer jelenség kapcsán tárgyaljuk.

Az intakt kontroll csoportokban a farmakológiai kezeléseket egyikük sem befolyásolta az SD-t jelölő negatív DC potenciál kitérés lefutását. Az iszkémiás állatokban azonban az SC-560 és az L161,982 jelentősen elnyújtotta az SD-t (fél amplitúdónál mért idő: 154 \pm 58 és 120 \pm 79 vs. 42 \pm 14 s; SC-560 és L161,982 vs. oldószer) (6.1.1. ábra, A panel; 6.1.3. ábra, A panel), és megnövelte a negatív DC potenciál kitérés AUC-jét (2104 \pm 1056 és 1958 \pm 1357, vs. 598 \pm 281 mV x s; SC-560 és L161,982 vs.

oldószer) (6.1.1. ábra, B panel). Az SC-560 és az L161,982 iszkémia során továbbá csökkentette az SD-t követő hiperpolarizációt is ($1,16 \pm 0,50$ és $1,40 \pm 0,62$, vs. $2,65 \pm 0,39$ mV; SC-560 és L161,982 vs. oldószer). Az NS-398 ezzel szemben az SD egyik mért változójára sem fejtett ki szignifikáns hatást.



6.1.1. ábra. A kezelések hatása a terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) jelző negatív egyenáramú (direct current, DC) potenciál-kitérés lefutására. **A:** Az iszkémia során kiváltott, SD-t jelző DC potenciál-kitérés (átlag \pm szórás) oldószer, a szelektív ciklooxygenáz-1 (COX-1) gátló SC-560 és a 4-es típusú prosztoglandin E₂ receptor (EP₄) antagonistá L161,982 rámosása után. **B:** Az SD-t jelölő negatív DC potenciál-kitérés görbe alatti területe (AUC, area under the curve). Az adatokat átlag \pm stdev formában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,01^{**}$), melyet a csoportok összehasonlításához Fisher post hoc teszt követett ($p < 0,01^{**}$ vs. intakt; $p < 0,01^{##}$ vs. oldószer).

Eredményeink azt mutatják, hogy a COX-1 szelektív gátlása, illetve az EP₄ receptor antagonizmusa az iszkémiás agykéregben késleltetik az idegszövet SD-t követő regenerációját. Nem várt eredmény azonban, hogy a COX-2 gátlása nem módosította az SD lefutását, annak ellenére, hogy a COX-2 kifejeződése iszkémia során jelentősen fokozódik, és a COX-2 gátlása bizonyítottan neuroprotektív.¹⁹¹ Az irodalmi adatok és a megfigyeléseink közötti eltérés valószínűleg abból adódik, hogy vizsgálataink az iszkémia akut szakaszára korlátozódtak, míg a COX-2 kifejeződése az iszkémia létrehozása után órák elteltével kezd emelkedni.^{36,92,279}

Az iszkémia akut szakaszában ugyan a COX-2 szerepe az SD-k utáni repolarizációban nem bizonyosodott be, de megmutattuk a COX-1 enzimátikus útvonal részesedését. Megfigyeléseink összefüggést mutatnak azokkal a korábbi eredményekkel, melyek szerint sivatagi futóegérben („gerbil”) az iszkémiát követő reperfüzió korai szakaszában a COX-1, kései szakaszában (i.e. 24 óra elteltével) pedig a COX-2 gátlása csökkentette az iszkémiával összefüggő hippocampális PGE₂ szintézist.³⁹ Bár a prosztanoid szignalizációs útvonalak szerteágazóak és összetettek, elképzelhető, hogy az iszkémia akut szakaszában az SD során a COX-1 útvonalon termelődő PGE₂ aktiválja az EP₄ receptorokat, ezzel segítve elő a repolarizációt (6.1.4. ábra). Figyelembe véve, hogy az SD elnyúló időtartama kiterjedtebb iszkémiás sérülést jelez előre,⁸⁹ az EP₄ receptor aktivációja, így az SD rövidülése az idegsejtek túlélését segítheti. Ezt támasztja alá az is, hogy az EP₄ receptorok genetikai inaktiválása rontja a stroke kimenetelét.⁸ Végül elképzelhető, hogy az iszkémiás infarktus méretének EP₄ receptor agonizmusával elért csökkenéséhez^{4,234} hozzájárul az EP₄ receptorok aktivációjával révén az SD rövidülése is.

Bár munkánk az EP₄ receptor szerepére koncentrált, a PGE₂ az EP₂ receptorokhoz kötődve is neuroprotektív hatás fejt ki,²⁵⁶ illetve adott körülmények között az EP₃ receptorok aktiválása is védő hatású lehet.^{1,192} Ezek alapján nem zárható ki az a lehetőség, hogy a COX-1 útvonalon képződő PGE₂ az EP₂ vagy EP₃ receptorok aktiválása révén is befolyásolhatja az SD időbeni lefutását.

A prosztaglandionok szerepe a terjedő depolarizációval járó agyi véráramlási változás kialakításában

Az enzimgátló/receptorblokkoló kezelések hatását az SD elektrofiziológiai jellemzőire elsősorban az iszkémiás csoportban figyeltük meg. A farmakológiai beavatkozások látható hatása a CBF válaszreakcióra ugyanakkor az intakt állatokban jelentkezett. Az iszkémia során a hiperémia amplitúdója a már leírtak szerint (5.4. fejezet) drasztikusan csökkent (6.1.2. ábra, A panel), melyre az alkalmazott enzimgátlók és az EP₄ receptorblokkoló nem voltak további hatással. Eredményeink indírt módon igazolni látszanak a neurovaszkuláris csatolás sérülését iszkémia során.¹⁹⁶ Ugyanakkor az is feltételezhető, hogy az iszkémia akut fázisában nagymértékben felszabaduló vazodilatív metabolitok, mint például az adenzin, a laktát és a kálium, valamint a megnövekedett ADP/ATP arány⁶⁵ felülírják a finomabban szabályozó jelátviteli útvonalakat. Végül fontolóra kell venni azt a lehetőséget is, hogy a prosztaglandinok értónus-szabályozó hatása az iszkémia szub-akut vagy krónikus fázisában válik nyilvánvalóvá, hiszen a COX-2 mRNS szintjének emelkedése kb. hat órával, az EP₄ receptor endothéliális erőteljesebb kifejeződése négy órával követi az iszkémia kialakulását.^{232,279}

A három farmakológiai beavatkozás közül a szelektív COX-2 gátló NS-398, és a szelektív COX-1 gátló SC-560 nem módosította a CBF válaszreakció jellemzőit az intakt kéregben sem. Ugyanakkor az EP₄ receptor blokkoló L161,982 csökkentette a hiperémia amplitúdóját az SD1 (21±11 vs. 51±38 %, intakt L161,982 vs. intakt oldószer) (6.1.2. ábra, B panel), és az rSD-k esetén is (50±21 vs. 76±37 %, intakt L161,982 vs. intakt oldószer). Az L161,982 továbbá elmélyítette az SD1-re jellemző oligémiát (58±13 vs. 40±14 %, intakt L161,982 vs. intakt oldószer) (6.1.2. ábra, C panel). Az L161,982-re vonatkozó eredmények azt mutatják, hogy a hiperémia csökkenésének és az oligémia elmélyülésének mértéke közel egyező volt. Ezek alapján arra következtetünk, hogy az EP₄ receptor szelektív antagonizmusa a CBF változás során egy olyan vazodilatátor komponenst gátolhatott, amely mind a hiperémia, mind az oligémia során folyamatosan érvényesült. Ezt látszik igazolni az is, hogy ha a hiperémia csúcsa és az oligémia minimuma közötti különbséget, azaz a vazoregulációs tartományt kiszámoljuk (átlagban 87±32 pp.), az intakt L161,982 és oldószeres csoportok között nem adódott különbség.

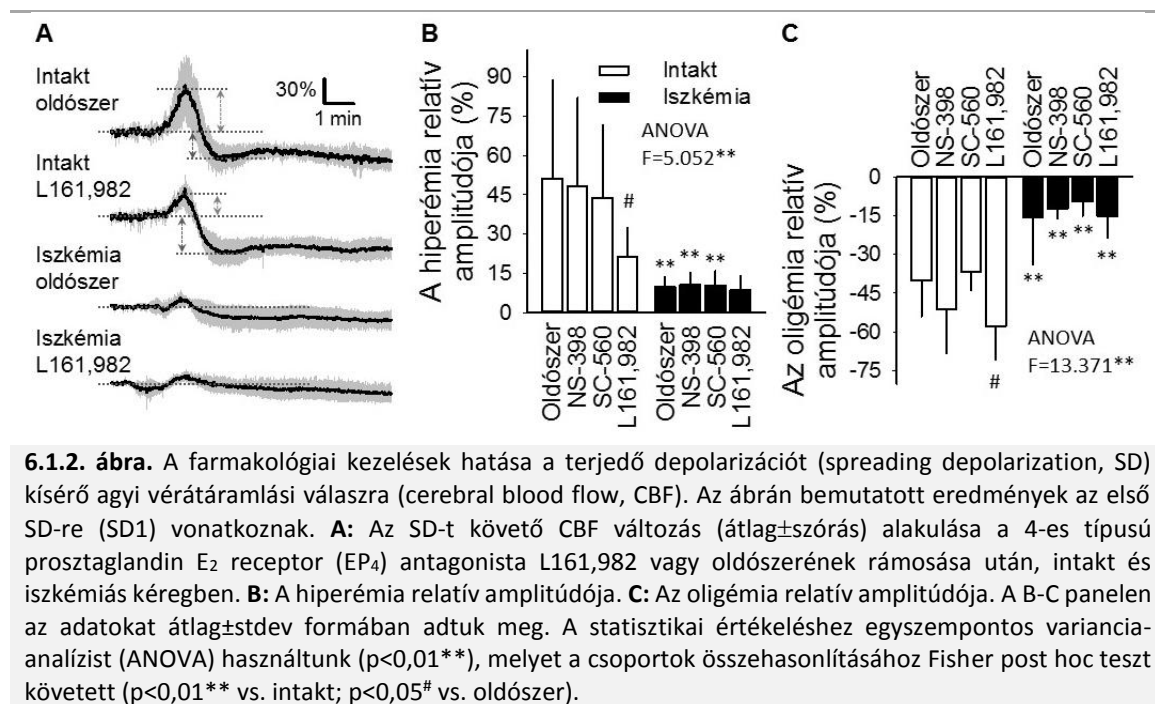
Az L161,982 vazodilatációt gátló hatását tükrözi továbbá, hogy a hiperémia kialakulása a kezelés hatására lassult az SD1-re (0,75±0,38 vs. 1,88±1,13 %/s, intakt L161,982 vs. intakt oldószer) és az rSD-kre nézve is (1,05±0,43 vs. 1,60±0,70 %/s, intakt L161,982 vs. intakt oldószer). Végül a hiperémia nagyságát jellemző AUC is markánsan csökkent L161,982 hatására mind az SD1 (874±462 vs. 2885±2543 % x s, intakt L161,982 vs. intakt oldószer), mind az rSD-k esetén (5532±3643 vs. 7448±2072 % x s, intakt L161,982 vs. intakt oldószer).

Eredményeink a prosztaglandinok vazodilatív szerepét új megvilágításba helyezték, hiszen az SD-t követő hiperémia kialakításában a vazodilatátor prosztanoidok részesevé eddig valószínűtlennek tűnt, illetve a prosztanoid szintézis gátlása a hiperémiás reakciót potenciózta.^{16,224,343} Ugyanakkor adataink összhangban állnak azokkal a kísérletes munkákkal, melyek a PGE₂ EP₄ receptor aktivációján keresztül elért agyi értágító hatását bizonyították. Így például az EP₄ receptor antagonizmusa gátolta a PGE₂-indukálta értágulatot patkány *arteria meningeae media*-ban *in vivo*, és az MCA-ban *in vitro*.^{79,268} Az EP₄ receptor blokkoló L161,982 továbbá az itt használt koncentrációban csökkentette az agyi arteriolák NMDA-val kiváltott dilatációját, a bajuszingerlésre válaszul kialakuló funkcionális hiperémiát,²¹⁶ és az agyi mikroerek glutamát-okozta tágulatát.¹⁵² Vizsgálataink alapján tehát elmondható, hogy az ép agykéregben az EP₄ receptor aktivációja áramlásnövekedést eredményez az SD-t követően is (6.1.4. ábra).

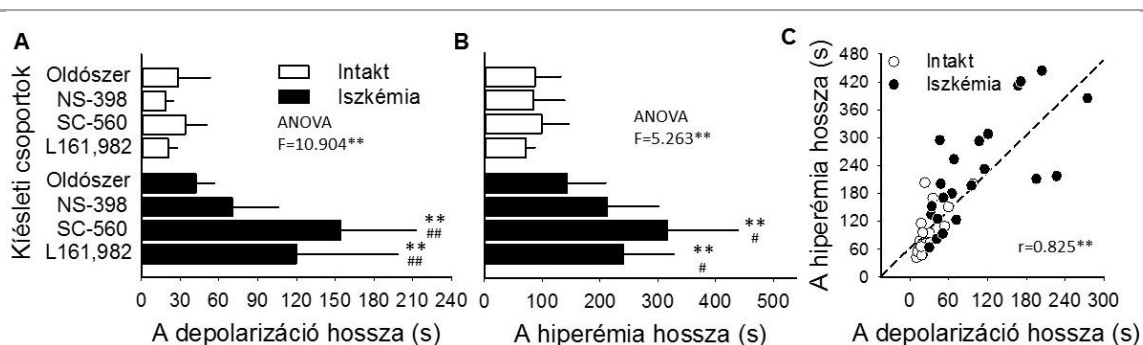
Kísérleteinkben a COX-1 és a COX-2 szelektív gátlása viszont nem befolyásolta érdemben az SD kapcsán kialakuló CBF változás egyik elemét sem (6.1.2. ábra), annak ellenére, hogy az NS-398

alkalmazásával elért COX-2 gátlás korábban meggyőzően csökkentette a bajuszingerlésre adott funkcionális hiperémiát.²⁷⁷ A várt hatás elmaradása mögött az állhat, hogy a COX enzimek SD-vel összefüggő fokozott aktivitása nem csak értágító, hanem érösszehúzó prosztanoidok, mint a prosztaglandin F 2α termelését is elősegíti.^{16,343} A COX enzimek gátlása tehát valószínűleg háttérbe szorítja mind a vazodilatátor, mind a vazokonstriktor prosztanoidok szintézisét. Ha ezek az SD során olyan arányban termelődnek, hogy egymással ellentétes hatásuk kioltódik, akkor a COX gátlással a CBF változás lefutása sem módosul. Ellenben ha az egyik útvonal effektor receptorát, például kísérleteinkben az értágító EP $_4$ -et blokkoljuk, a vasoaktív hatás érvényesülése megmutatható.

Összegezve megállapítható, hogy míg a neuronális aktivitásra válaszul kialakuló funkcionális hiperémia határozottan COX-2-függő,^{229,277,406} az SD-hez társuló hiperémia kialakításában a COX-2 útvonal szerepét enzimgátlással nem tudtuk bizonyítani. Az eltérés arra enged következtetni, hogy az SD-vel járó hiperémia háttérében működő jelátviteli utak eltérnek a fiziológiás neurovaszkuláris csatolástól. Feltételezzük, hogy az ép neuronális működés során az érösszehúzó prosztanoidok szintézise elhanyagolható, ellenben SD során szignifikáns mértékűvé fokozódik,³⁴³ ellensúlyozva az ugyancsak termelődő PGE $_2$ egyidejű, értágító hatását.



Az SD-hez társuló hiperémia hossza külön megfontolás tárgyát képezi, mivel az ezzel kapcsolatos megfigyeléseink jól megfeleltethetők az SD hosszával (6.1.3. ábra, A panel), de eltérnek a CBF változásra vonatkozó egyéb, fentebb bemutatott eredményektől (6.1.2. ábra). Az iszkémia alatt az SD-hez csatolt hiperémia időtartama jelentősen nőtt, különösen a COX-1 gátló SC-560 és az EP $_4$ receptor antagonistája L161,982 kezelés mellett (rSD-k esetén: 316 ± 122 és 240 ± 89 vs. 143 ± 67 s; SC-560 és L161,982 vs. oldószer) (6.1.3. ábra, B panel). A depolarizáció és a hiperémia időtartama között továbbá szoros, pozitív korreláció mutatkozott ($r = 0,825^{**}$) (6.1.3. ábra, C panel). Több közlemény szerint iszkémia során az elnyúló repolarizáció az energia-igényes ionpumpák működése révén fenntartja a szövet emelkedett metabolikus igényét,⁹⁶ mely késlelteti a hiperémia lecsengését is. Ezek alapján feltételezzük, hogy a COX-1 gátlás és az EP $_4$ receptor antagonizmus hatására elhúzódó hiperémia az SD megnövekedett időtartamát követte.



6.1.3. ábra. A farmakológiai kezelések hatása a terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) és a csatolt agyi vérátáramlási válasz (cerebral blood flow, CBF) időtartamára. Az A-B panelen az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk ($p<0,01^{**}$), melyet a csoportok összehasonlításához Fisher post hoc teszt követett ($p<0,01^{**}$ vs. intakt; $p<0,05^{\#}$ és $p<0,01^{\#\#}$ vs. oldószer). A C panelen illusztrált összefüggést egyoldali Pearson-féle korrelációs teszttel értékeltük ($p^{**}<0,01$).

Az EP_4 receptor szerepe az iszkémiás toleranciában

A fent részletezett vazokonstriktív és repolarizációt késleltető hatásán túl az L161,982 kezelés okozta a legnagyobb szórást minden mérési adat tekintetében. Nem várt eredmény, hogy olyan súlyos iszkémiás állapot alakult ki az L161,982 kezelésben részesült, 2VO-n átesett állatok harmadánál (6.1.2. táblázat), amelyet sem a COX gátlók, sem az oldószer adagolása mellett nem tapasztaltunk. A súlyos iszkémia a kísérleti protokoll pontos kivitelezését számos esetben megghiúsította (6.1.2. táblázat). Az L161,982 kedvezőtlen hatásának jeleit a következőkben foglaltuk össze (6.1.2. táblázat): (i) Az iszkémia kialakítását követően spontán, hosszan elhúzódó SD jelentkezett; (ii) A spontán SD után további rSD-t nem lehetett kiváltani; (iii) A spontán SD-vel szokásos, hiperémiás áramlási reakció elmaradt; (iv) A CBF az iszkémiát követő bármely tetszőleges időpontban alacsonyabbnak bizonyult a többi kísérleti csoporthoz képest; (v) A kísérleti állat néhány esetben a kísérlet végét jelentő túlaltatást megelőzően elpusztult ($n=2$). Az L161,982 kezelés tehát idegéletteni (pl. spontán SD megjelenése) és cerebrovaszkuláris (alacsony CBF) sérülésre utaló változásokat is okozott, ami jelezheti összehangoltságukat, illetve mind a neuronális, mind a vaszkuláris EP_4 receptorok részesedését.^{8,234}

Adataink megerősítik az EP_4 receptor agonizmusa, genetikai kiütése és kifejeződésének értékelése révén nyert azon eredményeket, melyek szerint az EP_4 receptor aktivációja iszkémiás események során elősegíti az idegsejtek túlélését, és javítja az iszkémia kimenetelét.^{4,8,234} Ennek ellenére nem számítottunk az L161,982 által okozott súlyos károsodásra, mert azok a vizsgálatok, amelyek ezzel a farmakonnal tesztelték az EP_4 receptor részesedését a neurovaszkuláris csatolásban, nem jegyezték meg az L161,982 kezelés potenciálisan káros kimenetelét.^{152,216} Az eddig közölt munkák továbbá nem értékelték az L161,982 idegéletteni hatását iszkémiával összefüggésben. Összefoglalva, azt feltételezzük, hogy az EP_4 receptorok aktivációja lényeges védő szerepet tölt be agyi iszkémiás infarktus során az SD időtartamának csökkentése révén.

6.1.2. táblázat. Két alcsoport elkülönítése az agyi iszkémia jellemzői alapján, a 4-es típusú prosztoglandin E₂ receptor (EP₄) antagonistá L161,982 alkalmazása mellett.

Értékelt jellemző	Teljes kísérleti protokoll (n=8)	Meghiúsult kísérleti protokoll (n=4)
Spontán SD kialakulása	Nincs (0/8)	Van (3/4)
Az első kiváltott SD (teljes protokoll) vagy a spontán SD (meghiúsult protokoll) időtartama (s)	95±64	520±328
rSD kiválthatósága	Kiváltható	Nem váltható ki
Az iszkémia indukciót követő CBF minimum (%)	33,7±19,8	12,3±7,0
Az első kiváltott SD-hez (teljes protokoll) vagy a spontán SD-hez (meghiúsult protokoll) csatolt CBF válasz lefutása	Hiperémiás	Nem értékelhető
CBF a kísérleti protokoll végén (%)	25,1±15,0	15,1±10,9

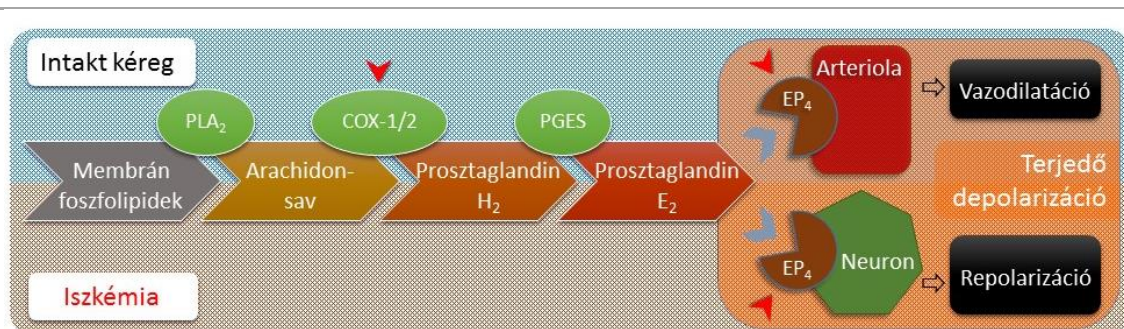
Az adatokat átlag±stdev formában adtuk meg. Rövidítések: CBF: agyi vérátáramlás (cerebral blood flow); SD: terjedő depolarizáció (spreading depolarization).

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Munkánkkal elsőként bizonyítottuk a neurovaszkuláris csatolásban fontos szerepet játszó, vazodilatátor prosztoglandinok hozzájárulását az SD-t követő hiperémia kialakulásához. Igazoltuk azt a munkahipotézisünkben előre vetített elképzelést (6.0.1. ábra), hogy a PG szignalizáció csak az ép agykéregben játszik kimutatható szerepet, míg iszkémia alatt veszít jelentőségéből, a háttérbe szorul, illetve más kórfolyamatokban játszik szerepet.

Az akut agyi sérülést (pl. stroke, SAH, TBI) elszenvedett betegek neurológiai intenzív kezelése során az SD előfordulási gyakoriságának csökkentése lényeges célkitűzés, hiszen ismert, hogy az SD események növekvő kumulatív időtartama esetén rosszabb a betegség prognózisa.^{98,108} Az SD-k visszaszorítására a klinikumban eddig egyedül az NMDA receptort blokkoló ketamin tűnt ígéretesnek,³²² illetve állatkísérletekre támaszkodva az NMDA csatorna nyitását moduláló magnézium védő hatását is mérlegelték.^{326,395}

Bár iszkémiás agysérülések kapcsán régóta elismerik a PGE₂ és receptorainak szerepét az idegsejtek túlélésének szabályozásában, az SD-vel eddig ezt nem hozták összefüggésbe. Elsőként mutattuk meg, hogy a COX-1 vagy az EP₄ receptor gátlása elnyújtja az SD-t az agyi iszkémia korai szakaszában, tehát a prosztoglandinok felszabadulása és receptoraik aktiválása elősegíti az SD utáni repolarizációt (6.1.4. ábra). Megfigyeléseink további kutatások alapját képezik a prosztanoid szignalizáció szerepének pontos megismerésére az SD kapcsán. Hosszabb távon a prosztoglandin szignalizációs útvonalak azonosított elemei új célpontot jelölhetnek ki az SD-vel összefüggő iszkémiás sérülések mérséklésére.



6.1.4. ábra. A prosztaglandin E₂ bioszintézise, vizsgált értágító jelátviteli útja, és az eredményeink alapján feltételezett hatása a terjedő depolarizációra és a csatolt agyi vérátáramlási válaszra. A piros nyílhegyek a kísérleteinkben alkalmazott farmakológiai kezelések célpontjait jelölik. Rövidítések: PLA₂: foszfolipáz A₂; COX, ciklooxygenáz enzim; EP₄, 4-es típusú prosztaglandin E₂ receptor; PGES, prosztaglandin-E-szintáz.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

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.

6.1. Az agyszövet kémhatásának szerepe

Háttér

Régóra ismert jelenség, hogy a hiperkapnia az agyi erek erőteljes tágulatát okozza, melyet a vér és az agyszöveti pH csökkenésével, azaz savas irányú eltolódsával hoznak összefüggésbe.²²⁰ Az extracelluláris pH lokális csökkenése az agykéregben azonban CO₂-tól független módon is értágító hatású lehet.^{28,422}

Az agyszövet savasodásához adott körülmények között hozzájárul a laktát felszaporodása.^{198,283,305} A metabolikus hírvivőként is számon tartott laktát neuronális aktivitás során monokarboxilát-transzportereken vagy egyéb csatornákon keresztül az extracelluláris káliumszint emelkedésének hatására ürül az asztrocitákból.^{11,354} A felszabaduló laktát a szövet metabolikus állapotának függvényében gátolja a prosztaglandin transzportereket, így lehetővé teszi, hogy a PGE₂ a 6.1. fejezetben részletezettek szerint kifejtse értágító hatását.¹⁴⁴ Az SD során az ép agykéregben a laktát koncentrációja megközelítőleg 50 %-os emelkedést mutat,³³² mely időben megfeleltethető az SD-vel járó acidózisnak³³² és hiperémiának.¹³² Azt is megfigyelték, epilepsziás roham során a szöveti pH csökkenése részt vesz a funkcionális hiperémia kialakulásában.²¹⁴ Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy az agyszöveti pH csökkenése – valószínűleg a laktát szintjének függvényében – hozzájárul az SD-hez csatolt CBF válaszreakció kialakulásához. Ennek igazolására célul tűztük ki az SD, a vele járó szöveti acidózis és a következményes hiperémia mértéke közötti összefüggés értékelését. Hipotézisünk igazolása bizonyítékkal szolgálhat arra, hogy az SD-hez társuló hiperémia reaktív jellegű, szabályozása metabolikus hírvivőkhöz köthető.

Módszerek

A kísérleti csoportok és módszerek megegyeznek a 4.3 és az 5.4. fejezetben bemutatott elektrofiziológiai kísérleteknél tárgyaltakkal. Az SD-t jelző DC potencál-kitérés, az SD-vel járó acidózis, és a következményes hiperémia amplitúdója és időtartama között átfogó korrelációs analízist végeztünk. Az adatsorok közötti összefüggések értékeléséhez kétoldali Pearson-féle

korrelációs tesztet alkalmaztunk ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, IBM Corp.).

Az alacsony szöveti pH kisebb amplitúdójú SD kialakulását eredményezi

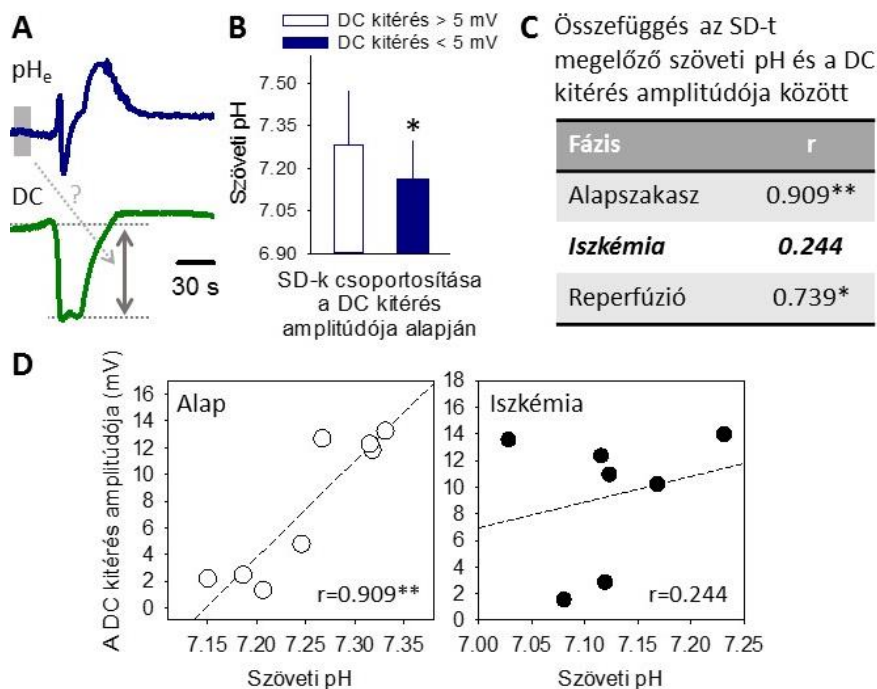
Régóta elfogadott nézet, hogy az alacsony szöveti pH mérsékli az SD kiválthatóságát és terjedését, melyet abból vezettek le, hogy élő agyszöveteken a fiziológiásnál savasabb kémhatású médium rámosása késleltette az SD megjelenését, és lassította terjedését.^{382,384} Az alacsony szöveti pH SD-t mérséklő hatását annak tulajdonították, hogy az extracelluláris térben felszaporodó protonok gátolják az NMDA receptorokat,³⁷⁷ vagy módosítják a feszültség-függő K^+ , Na^+ és Ca^{2+} csatornák kapuzását illetve konduktanciáját.³⁸³

Adatelemzésünk során első megközelítésben az SD eseményeket amplitúdójuk alapján két csoportra osztottuk, az 5 mV-nál kisebbekre, és az 5 mV-nál nagyobbakra. Azt tapasztaltuk, hogy az 5 mV-nál kisebb eseményeket tipikusan alacsonyabb szöveti pH előzte meg (pH $7,20 \pm 0,04$ vs. $7,31 \pm 0,03$) (6.2.1. ábra, B panel). Az ezt követő korrelációs analízis erős pozitív összefüggést tárt fel az SD-t megelőző szöveti pH és az SD amplitúdója között sértetlen agykéregben ($r=0,909^{**}$), mely az iszkémia alatt nem volt tettenérhető ($r=0,244$), a reperfúzió során viszont ismét helyreállt ($r=0,739^*$) (6.2.1. ábra, C-D panel).

Az 5.2. fejezetben bemutattuk, hogy az SD amplitúdója fokozatosan csökken, ahogy egy esemény a terjedése során lecseng (5.2.5. ábra). Ha elfogadjuk, hogy az SD csökkenő amplitúdója a lecsengés fázisának feleltethető meg, megfogalmazódik az a magyarázat, hogy az alacsony, de még fiziológiás tartományban mozgó szöveti pH nem csak az SD kiválthatóságát és terjedési sebességét,³⁸⁴ hanem az SD által megtett távolságot is korlátozza. Ennek fényében érdekes megfigyelés, hogy az iszkémiás agykéregben a szöveti pH nem befolyásolja az SD amplitúdóját (6.2.1. ábra, C-D panel), azaz feltehetően nem rövidíti az SD által megtett utat. Valószínű, hogy más, az iszkémiával kapcsolatos biokémiai változások felülírják az alacsony szöveti pH az SD terjedésére gyakorolt gátló hatását. A glutamát például, mely az SD tovaterjedését NMDA receptorok és feszültség-függő Ca^{2+} csatornák aktiválásával illetve nyitásával segíti elő,^{173,297,397} iszkémia során jelentősen felszaporodik az idegszövetben,^{26,37} így az alacsony pH SD-t gátló hatását hatékonyan ellensúlyozhatja. A glutamáthoz hasonlóan a K^+ ion is részt vesz az SD fenntartásában,^{146,297} iszkémiás agyszövetben koncentrációja az extracelluláris térben sokszorosára emelkedik (2-4 mM-ról 9-12 mM-ra), mely kedvez az SD kialakulásának és lefolyásának.^{154,155} Összefoglalva, iszkémiás agykéregben a szöveti pH SD-t mérséklő hatása valószínűleg elhanyagolható a magas koncentrációjú glutamát, K^+ , vagy a kettő kombinációjának SD-t támogató hatásával szemben.

Sértetlen agykéregben az SD intenzitása, a szöveti acidózis és a hiperémia mértéke összefügg

Az ion-szelektív elektróda használatán alapuló szöveti pH mérés a módszer jellegéből adódóan magában foglalja a DC potenciál elvezetését is (i.e. referencia),⁴⁰² ezért a két változó direkt megfeleltethető egymásnak. Ennek ellenére az SD-t jelző DC potenciál-kitérés és a csatolt acidózis számszerűsített jellemzőinek kapcsolatát nem írták le. Azok a kutatások, amelyek az SD jellemzésére pH-szenzitív elektródát alkalmaztak, a pH szabályozás sejtszintű mechanizmusait tárták fel farmakológiai módszerekkel,²⁶⁷ vagy a szöveti pH és a laktát koncentrációja közötti kapcsolatot vizsgálták.³³² Későbbi *in vitro* vizsgálatok az acidózist megelőző, rövid alkalotikus kitérésre koncentráltak azzal a céllal, hogy megállapítsák szerepét az SD kialakulásában iszkémiás idegszövetben.^{257,384}



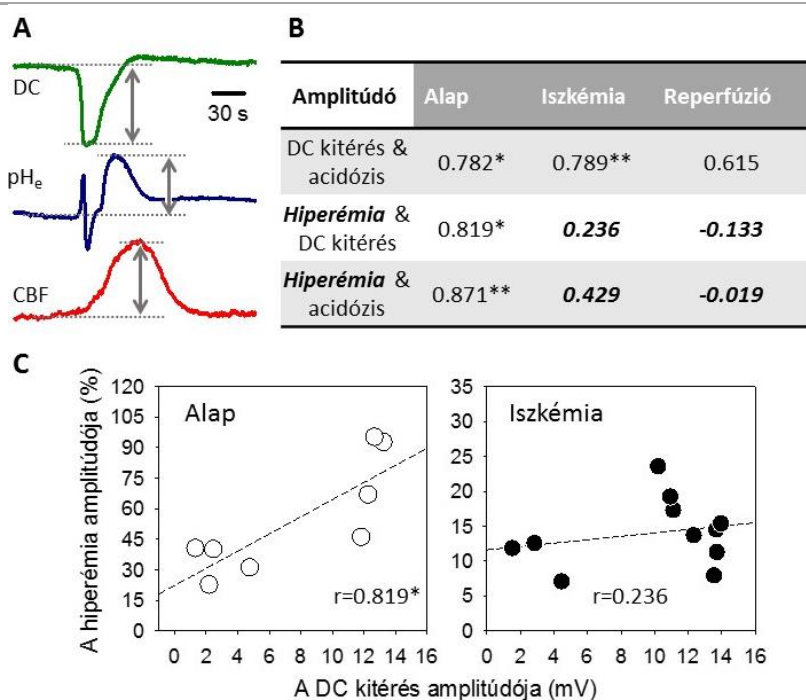
6.2.1. ábra. Összefüggés a terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) megelőző szöveti pH és az SD-t jelölő DC potenciál kitérés amplitúdója között. **A:** Az értékelt változók reprezentatív ábrázolása. **B:** Az SD-t megelőző szöveti pH értéke a későbbi SD amplitúdója szerinti. A statisztikai analízist független T-próbával végeztük ($p < 0,05^*$). **C:** A kétoldali Pearson-féle analízissel kapott korrelációs koeficiensek áttekintése a kísérletek három szakaszára nézve ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; $n = 7/8$). A szignifikáns összefüggés iszkémiával kapcsolatos megszűnését vastag betűvel emeltük ki. **D:** Az SD-t megelőző szöveti pH és az SD-t jelölő DC potenciál kitérés amplitúdójára vonatkozó reprezentatív diagrammok. Az üres szimbólumok a sértetlen, a feket szimbólumok az iszkémiás körülményt jelölik. Rövidítések: pH_e : extracelluláris pH.

Adataink értékelése során azt találtuk, hogy a sértetlen agykéregben (i.e. a kísérletek alap szakaszában) az SD-vel a DC potenciál-kitérés, az acidózis és a hiperémia amplitúdója szoros pozitív korrelációt mutat (**6.2.2. ábra**). Ezzel szemben a három változó paraméter hossza között nem találtunk kapcsolatot (**6.2.3. ábra**). A mélyebb DC potenciál-kitérés tehát nagyobb amplitúdójú acidózist feltételezett. Ha elfogadjuk, hogy a nagyobb amplitúdójú DC potenciál-kitérés intenzívebb depolarizációt jelöl, eredményünk összhangot mutat azokkal a kísérletes és klinikai nem-invazív képalkotó vizsgálatokkal, melyek szerint a fokozott neuronális aktivitás arányos mértékű intra- és extracelluláris acidózissal jár.^{59,242}

Adataink szerint ép agykéregben az SD-vel járó acidózis és a következményes hiperémia amplitúdója is erősen korrelál egymással. Amennyiben a két változó között az összefüggés nem csupán egybeesés, hanem ok-okozati kapcsolat (**6.2.4. ábra**), igazolódni látszik az SD-t kísérő CBF változás metabo-vaszkuláris szabályozására vonatkozó hipotézisünk.

Iszkémia során a hiperémia amplitúdója független, hossza megfelel az SD-nek és az acidózisnak

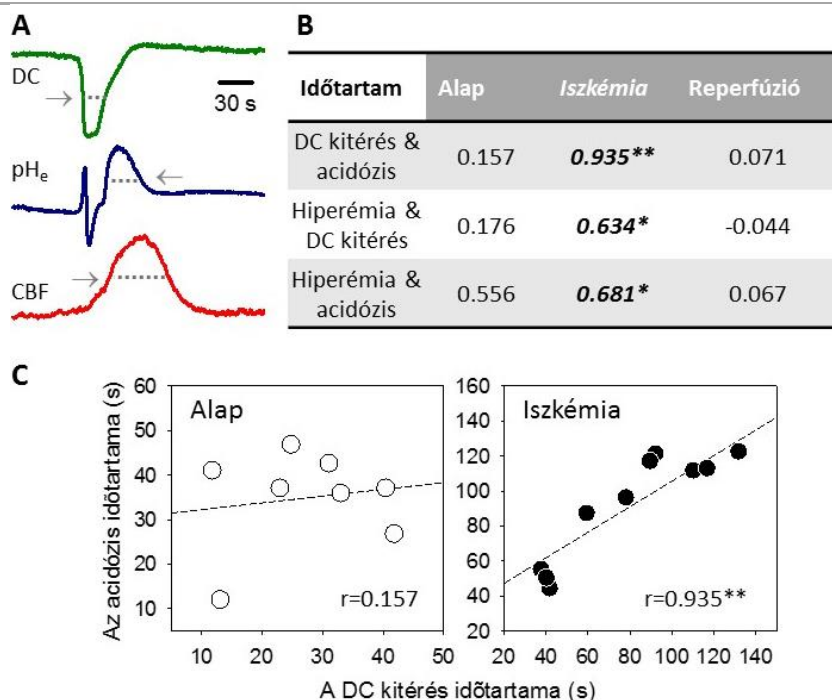
Az iszkémia alatt – a sértetlen kéregtől eltérően – az SD-vel járó hiperémia amplitúdója nem korrelált a DC potenciál kitérés vagy az acidózis amplitúdójával, és az eredeti, alap szakasz alatt megfigyelt összefüggés a reperfúzió alatt sem állt helyre (**6.2.2. ábra**). Ugyanakkor az iszkémia nem befolyásolta az SD-t jelölő DC potenciál kitérés és az acidózis amplitúdója közötti kapcsolatot ($r = 0,789^{**}$) (**6.2.2. ábra, B panel**).



6.2.2. ábra. Korrelációs vizsgálat a terjedő depolarizációt jelölő DC potenciál kitérés, az ezzel összefüggő szöveti acidózis, és a következetes hiperémia amplitúdója között. **A:** Az értékelt változók reprezentatív ábrázolása. **B:** A kétoldali Pearson-féle analízissel kapott korrelációs együtthatók áttekintése a kísérletek három szakaszára nézve ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). A szignifikáns összefüggés megszűnését vastag betűvel emeltük ki. **C:** Az iszkémia hatását az összefüggésekre a DC potenciál kitérés és a hiperémia amplitúdójára vonatkozó reprezentatív diagrammok mutatják be ($n=8/11$). Az üres szimbólumok a sértetlen, a feket szimbólumok az iszkémiás körülményt jelölik. Rövidítések: CBF: agyi vérátáramlás (cerebral blood flow), pH_e: extracelluláris pH.

Saját, korábbi kísérleti eredményeink is igazolják, hogy iszkémiás állapotban az SD-t követő hiperémia amplitúdója jelentősen csökken (5.4. és 6.1. fejezet). Ugyanakkor az iszkémia nincs hatással az SD-t jelölő DC potenciál kitérés amplitúdójára (Isd. 7.4. fejezet). Ezek a megfigyelések és az itt bemutatott korrelációs vizsgálatok együttesen arra utalnak, hogy bár az SD iszkémiás körülmények között intenzitását tekintve megtartott, az eseményhez kapcsolódó CBF változás jelentősen módosul, ami a csatolás elégtelenségére enged következtetni.

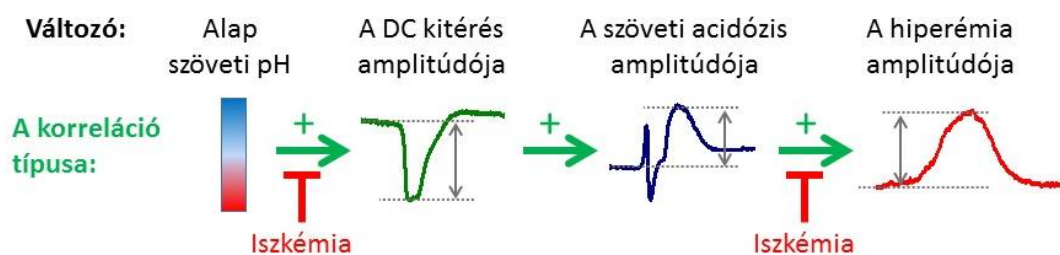
Bár a hiperémia amplitúdója aránytalanul alacsonyabbnak bizonyult iszkémia alatt, időtartama az SD és az acidózis hosszának függvényében alakult (6.2.3. ábra). A három változás időbeni lefutása ugyanakkor sem az alap szakasz, sem a reperfúzió során nem mutatott korrelációt (6.2.3. ábra). Az elnyúló DC potenciál kitérés az iszkémia és az öregkor kapcsolatát tanulmányozó kísérleteinkben is hosszabban tartó hiperémiát vont maga után (Isd. 7.4. fejezet). Az SD utáni repolarizáció, illetve a neuronális aktivitás visszatérésének késése azt feltételezi, hogy az energiaigényes Na⁺/K⁺-pumpa ATP hiányában nem képes a nyugalmi membránpotenciál helyreállítására.⁹⁶ Úgy gondoljuk tehát, hogy az iszkémia miatt jelentkező elhúzódó energiaigény lehet felelős a hiperémia huzamosabb fenntartásáért.



6.2.3. ábra. Korrelációs vizsgálat a terjedő depolarizációt jelölő DC potenciál kitérés, az ezzel összefüggő szöveti acidózis, és a következetes hiperémia időtartama között. **A:** Az értékelt változók reprezentatív ábrázolása. **B:** A kétoldali Pearson-féle analízissel kapott korrelációs együtthatók áttekintése a kísérletek három szakaszára nézve ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). Az iszkémiával kapcsolatos szignifikáns összefüggést vastag betűvel emeltük ki. **C:** Az iszkémia hatását az összefüggésekre a DC potenciál kitérés és a hiperémia amplitúdójára vonatkozó reprezentatív diagrammok mutatják be ($n=8/11$). Az üres szimbólumok a sértetlen, a feket szimbólumok az iszkémiás körülményt jelölik. Rövidítések: CBF: agyi vérátáramlás (cerebral blood flow), pH_e : extracelluláris pH.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Adatértékelésünk legfontosabb megállapítása az, hogy míg a sértetlen agykéregben az SD-t követő hiperémia mértéke a depolarizáció intenzitásának, és az ezzel járó szöveti acidózisnak a függvénye, addig iszkémia során a hiperémia amplitúdója aránytalanul kisebb, időtartama viszont az SD-vel és az acidózissal arányban nyúlik meg. Megfigyeléseink alátámasztják hiptotézisünket, amely szerint az SD-hez csatol CBF változás kialakulásában szerepet játszó mediátorok meghatározó mértékben tartalmaznak metabolikus komponenseket (például a szöveti pH változása) (6.0.1. ábra). Munkánk továbbá rávilágít arra, hogy iszkémiás állapotokban a metabo-vaszkuláris csatolás egyensúlya felborul, és az érválaszok nem képesek követni a szövet metabolikus igényeinek növekedését. Végül megállapítottuk, hogy bár a savasabb pH az élettani tartományban gátolja az idegszöveti depolarizációt, iszkémia során egyéb, serkentő metabolitok az acidózis az agyszövet aktivitását mérséklő hatását felülírják.



6.2.4. ábra. Az iszkémia hatása a szöveti pH, a terjedő depolarizáció és az áramlási válasz amplitúdójának feltételezett ok-okozati viszonyára.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

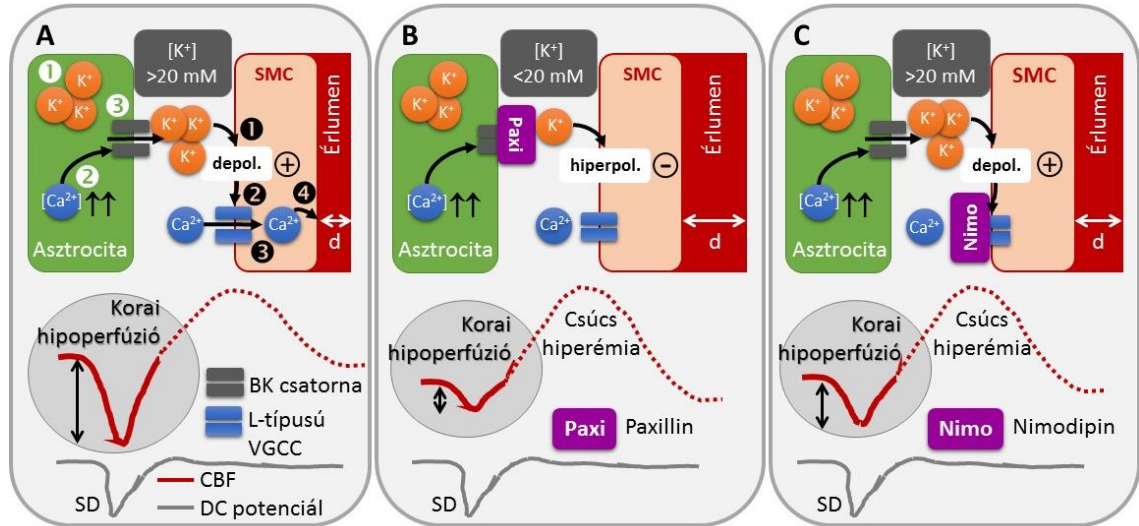
Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Bari F, **Farkas E.** Age or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarization in the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;313(2):H328-H337.

6.3. A kálium extracelluláris felszaporodásának szerepe

A káliumion, mely fokozott neuronális aktivitás során felhalmozódik az extracelluláris térben, nagyon hatékonyan szabályozza az érátmérőt. Koncentráció-függő módon, 20 mM alatt tágítja, 20 mM felett összehúzza az ereket.²¹⁵ Az SD-vel az idegszövet extracelluláris kálium koncentrációja ($[K^+]_e$) több, mint tízszeresére, a 3-4 mM-os nyugalmi alapértékről akár 30-60 mM-ra is emelkedhet.^{16,349} Bár az SD-t jelző negatív DC potenciál-kitérés minimum pontja és az SD-hez társuló CBF változás korai hipoperfúziós komponense időben jól megfeleltethető egymásnak,¹⁶ nincs kísérletes bizonyíték arra, hogy a korai vazokonstriktív direkt módon a magas $[K^+]_e$ -nak tulajdonítható.

A K^+ bonyolult jelátviteli utakon keresztül éri el vazoaktív hatását (**6.3.1. ábra**). Az extracelluláris térben felhalmozódó, felesleges K^+ -ot az asztrociták veszik fel, valószínűleg Kir4.1-es kálium csatornákon keresztül,²⁰⁵ majd a K^+ -ot részben a végtalpaikon elhelyezkedő nagy konduktanciájú, Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornákon (BK csatorna) át ürítik a perivaszkuláris térbe.¹⁴⁰ A perivaszkuláris $[K^+]$ koncentráció akkor érheti el a vazokonstriktív tartományt, ha az asztrocita-végtalpakban a BK csatornák aktivációját szabályozó Ca^{2+} koncentrációja 300-400 nM-ről 700-800 nM-ra emelkedik,¹⁴⁰ ami a BK csatorna megnyílásának esélyét egyes becslések szerint tizenhatszorosára emeli.¹⁸³ A perivaszkuláris $[K^+]$ emelkedése a depolarizáció irányába tolja el az érsimaizomsejtek membránpotenciálját, megnyitja a simaizomsejtek feszültségfüggő Ca^{2+} csatornáit (voltage-gated Ca^{2+} channel, VGCC), így a vaszkuláris simaizomsejtbe Ca^{2+} áramlik be, ami vazokonstriktív eredményez.²⁰⁶ Kísérleteink célja tehát az volt, hogy bizonyítsuk a K^+ meghatározó szerepét az SD-hez kapcsolódó korai vazokonstriktív létrejöttében (**6.3.1. ábra, A panel**), és hogy meghatározzuk az asztrociták végtalpain elhelyezkedő BK csatornák, valamint az érsimaizom feszültségfüggő Ca^{2+} csatornáinak részesedését a hipoperfúzió kialakulásában (**6.3.1. ábra, B-C panel**).

Korábbi kísérleti eredmények arra is utaltak, hogy az SD-vel együtt jelentkező korai hipoperfúziót erősítheti, ha az SD-t megelőző, vagy SD-k közötti időszakban a szövetben az alap $[K^+]_e$ meghaladja a fiziológiás értéket.⁹⁷ A fokális agyi iszkémia vagy SAH kísérletes rágcsáló modelljeiben az alap $[K^+]_e$ a fiziológiás 2-4 mM-ről tipikusan 6-9 mM-ra emelkedik.^{153,158,294} A magas alap $[K^+]_e$ nem csak cerebrovaszkuláris hatással bír; *in vitro* agyszelet preparátumban megfigyelték, hogy elnyújtja az SD időtartamát is.¹⁰⁶ Ezek alapján tehát arra is kíváncsiak voltunk, hogy az SD-t megelőző alap $[K^+]_e$ miként befolyásolja az SD-re jellemző, drasztikus $[K^+]_e$ felszaporodás mértékét és kinetikáját, ezzel a CBF változását.



6.3.1. ábra. A munkahipotézis, és a farmakológiai beavatkozások célpontjai. **A:** A terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD; szürke folytonos vonal a panel alján) az extracelluláris térben a glutamát és a K^+ felszaporodását eredményezi.^{297,351} A felesleges K^+ -ot az asztrociták veszik fel (①).²¹⁹ Ezzel párhuzamosan az asztrocitákban feldúsul a Ca^{2+} úgy, hogy Ca^{2+} áramlik a sejtekbe feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül,²³¹ illetve a glutamát az asztrociták metabotróp glutamát receptorain hatva Ca^{2+} -ot szabadít fel az intracelluláris raktárakból¹¹ (②). Az asztrocitákban megemelkedett Ca^{2+} szint az asztrocitavégtagokon nyitja a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornákat (BK csatorna), és a K^+ a perivaszkuláris térbe ürül (③).¹⁴⁰ A perivaszkuláris tér K^+ koncentrációjának növekedése (>20 mM) a vaszkuláris simaizomsejt (smooth muscle cell, SMC) membránpotenciálját a depolarizáció irányába tolja (①), ami az SMC feszültségfüggő Ca^{2+} csatornáinak (voltage-gated Ca^{2+} channel, VGCC) nyitásához (②), Ca^{2+} beáramláshoz (③), végül vazokonstrikciónak (④) vezet.²⁰⁶ Hipotézisünk szerint ez a jelátviteli út alakítja ki az SD-t követő vérátáramlási válasz (piros szaggatott vonal) első, hipoperfúziós komponensét (piros folytonos vonal). **B:** A BK csatornákat blokkoló paxillin $1 \mu M$ koncentráció alatt szelektíven az asztrocita-végtag BK csatornáira hat,¹⁴⁰ gátolja a K^+ feldúsulását a perivaszkuláris térben, így az SMC membránját hiperpolarizálja. Az SMC-n elhelyezkedő VGCC-k így zárva maradnak, és az érátmérő nem szűkül. Mindezek alapján azt várjuk, hogy a paxillin kezelés kivédi az SD-t kísérő CBF változás korai vazokonstriktív komponensének kialakulását. **C:** A nimodipin egy szelektív L-típusú VGCC antagonist,⁵ amely nem befolyásolja a perivaszkuláris K^+ koncentrációt. A nimodipin kezelés tehát megakadályozza a VGCC-n keresztül a Ca^{2+} beáramlását az SMC-be, így csökkenti a vazokonstrikciónak. Kísérleteinkben a nimodipin alkalmazásától azt várjuk, hogy csökkenti az SD-hez csatolt CBF változás korai vazokonstriktív komponensének mértékét.

A $[K^+]_e$ -ot hagyományosan K^+ -szenzitív mikorelektrodák segítségével mérik.^{158,404} A néhány meghatározott pontba beültetett elektrodákkal és a lézer-Doppleres áramlásmérővel szimultán regisztrált változók összevetése nem teszi lehetővé a neurovaszkuláris csatolás idő- és térbeli mintázatának pontos elemzését. A közelmúltban egy újonnan fejlesztett, fluoreszcens K^+ indikátor segítségével (Asante Potassium Green 2, APG-2; TEFLabs, Inc., Austin, TX, USA) sikeresen tették láthatóvá az $[K^+]_e$ változásait görcsaktivitás során patkány agykéregben.²⁵ A módszertani újítást kihasználva arra vállalkoztunk, hogy két-foton mikroszkópiával, térben és időben képezzük le az $[K^+]_e$ változásait SD során egér agykéregben. A $[K^+]_e$ -t mutató optikai jelet továbbá összevetettük rodamin-dextránnal feltöltött kérgi arteriolák átmérőváltozásaival. Külön kísérletsorozatban az $[K^+]_e$ és a CBF összefüggéseinek kvantitatív értékelésére K^+ -szenzitív mikorelektrodát és lézer-Doppleres áramlásmérést alkalmaztunk. Ebben a kísérletsorozatban a kiindulási $[K^+]_e$ és az SD során bekövetkező $[K^+]_e$ felszaporodás kapcsolatát is értékeltük. Végül a BK csatornák és az L-típusú VGCC-k szelektív farmakológiai gátlásával kívántuk bizonyítani az egyes csatornák részesedését az SD-t követő korai hipoperfúzió kialakításában (6.3.1. ábra).

Módszerek

Két-foton mikorszópi

C57Bl/6 egereket (n=8) 1 % Avertinnel altattunk (20 μ l/g, i.p.), az állatokat melegítópárnára fektettük, majd fejüket sztereotaxiás befogóba rögzítettük. A jobboldali parietális koponyaacsontot megnyitottuk (d=3 mm), és a kérgi felszínről a *dura matert* eltávolítottuk. A feltárt agyfelszínre Ringer-HEPES oldatban (150 mM NaCl; 5,2 mM KCl; 2,2 mM CaCl₂; 0,2 mM MgCl₂; 6 mM NaHCO₃; 5 mM HEPES; 2,8 mM D-glükóz; pH=7,4), 0,76 mM koncentrációban APG-2-t mostunk (TEFLabs, Inc., Austin, TX, U.S.A.) (n=7), vagy kontrollként a Ringer-HEPES oldatot önmagában alkalmaztuk (n=1). A koponyaablakot mikroszkópos fedőlemezzel zártuk, majd tőle *rostralis* irányban egy második kraniotómiát hoztunk létre SD-k kiváltására (6.3.2. ábra, A panel). Nyílását a feltárt kérgi területre irányozva egy 1 M KCl-al feltöltött üvegkapillárist rögzítettünk fogászati cementtel a koponyaacsonthoz, és a kapillárist mikrodialízis pumpához csatlakoztattuk (CMA/100, CMA/Microdialysis, Solna, Svédország). Az erek egyértelmű azonosítására az agyi érhálózatot rodamin-dextránnal töltöttük fel, melyet retro-orbitális úton juttattunk be (D1841, Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Magyarország; 2-10 mg/100 μ l Ringer-HEPES oldat). Az *in vivo* intrakraniális mikroszkópos vizsgálatot egy FEMTO2D-Alba mikroszkóppal végeztük (Femtonics Ltd., Budapest, Magyarország) 20-as nagyítású víz immerziós objektívet (XLUMPLFLN-20XW, Olympus) és a mikroszkóp számítógépes MES programját használva (v4.6.2336, Femtonics). Az APG-2 és a rodamin együttes, két-fotonos gerjesztést 810 nm hullámhosszon egy Mai Tai HP típusú titán-zafír lézerrel értük el (RK TECH Ltd., Budapest, Magyarország). Megfelelő színszűrők alkalmazása mellett az emissziót gallium- és arzén-foszfiddal bevont fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk. A lézer teljesítményét a képképzési mélység függvényében (0-300 μ m) 10-40 %-ra állítottuk, a fotoelektron-sokszorozót 70 % feszültségérték mellett üzemeltettük. Az arteriolák és venulák azonosítására z-stack képsorokat vettünk fel 5 μ m-es léptéssel az agyfelszínre merőleges irányban. A kiválasztott keresztmetszeti síkban 1 μ m/pixel térbeli és 0,8-2 Hz időbeli felbontással megközelítőleg 10 perces képsorokat rögzítettünk. Az alapszakasz felvétele után a *rostralis* koponyaablakból 15-20 perces időközönként SD-ket váltottunk ki úgy, hogy 1-4 μ l 1 M KCl-ot fecskendeztünk a rögzített üvegkapilláris és a mikrodialízis pumpa segítségével az agyfelszínre. Az APG-2 és rodamin képsorokat FIJI24-ben automatikus képkiegyenlítés után összevontuk, és RGB színskálára helyeztük át az érátmérők manuális méréséhez.³³³

Elektrofiziológia és agyi vérátáramlás-mérés

Az egereket (n=15) 1,5-2 % izofluránnal altattunk N₂O:O₂ gázkeverék 2:1 arányú elegyében belélegeztetve; testhőmérsékletüket rektális hőmérővel visszacsatolt melegítópárnával 37 °C-on tartottuk (Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.). Az állatok jobb parietális koponyaacsontján a fejet sztereotaxiás befogóba rögzítve két kraniotómiát hoztunk létre. A *rostralis* ablakban később SD-ket váltottunk ki, míg a *caudalis* ablakból K⁺-szenzitív mikroelektrodával [K⁺]_e-t regisztráltunk, referencia elektrodával DC módban szűrt LFP-t vezettünk el, és lézer-Doppleres áramlásméréssel a CBF változásait követtük.

Az ionszelektív elektrodákat Viitanen et al., (2010) módszere szerint készítettük. Üvegkapilláris mikroelektrodák hegyét (külső átmérő: 10-12 μ m) ioncserélő folyadékmembránnal (Potassium ionophore I - cocktail A; Sigma), az elektrodák nyakát 100 mM KCl-el töltöttük fel.²⁵ A K⁺-szenzitív mikroelektrodákat ismert koncentrációjú KCl oldatok segítségével több pontra kalibráltuk (1, 3, 5, 10, 30, 50, 100 mM). A kalibrált K⁺-szenzitív elektrodákat mikromanipulátorral az altatott egerek agykérgébe ültettük be, közvetlenül egy 150 nM NaCl-al és 1 mM HEPES-el feltöltött referencia-elektroda mellé (d=20 μ m), mellyel DC módban szűrt LFP-t regisztráltunk. A közös földelést a nyak

bőre alá beültetett Ag/AgCl elektróda szolgálta. A mikroelektródákat Ag/AgCl szálakkal egy a laboratóriumunkban erre a célra készített, két csatornás, magas bemeneti ellenállású elektrométerhez kötöttük (beépítve: AD549LH, Analog Devices, Norwood, MA, U.S.A.). A referencia elektródával elvezetett feszültségjelet differenciálerősítőn és megfelelő szűrőkön (NL106 és NL125, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) átvezetve vontuk ki a K^+ -szenzitív elektródával felvett jelalakból, hogy a $[K^+]_e$ -nak megfeleltethető feszültségváltozásokat kapjunk. Végül a jelet digitalizáltuk (analóg-digitális átalakító: MP150, Biopac Systems, Inc., U.S.A.), és folyamatosan, 1 kHz frekvenciával rögzítettük. A regisztrátumokat valós időben számítógép monitoron jelenítettük meg, és a későbbi elemzésekhez számítógép merevlemezén tároltuk (szoftver: AcqKnowledge 4.2.0; Biopac Systems Inc., U.S.A.). A valós $[K^+]_e$ értékeket további jelfeldolgozás révén a nyers, mV-os skáláról lineáris regresszióval, legkisebb négyzetes módszer alkalmazásával kaptuk meg. A CBF változásait lézer-Doppleres áramlásméréssel regisztráltuk (4.3. fejezet). A kész preparátumra az elektromos zaj csökkentése érdekében Faraday-kalitkát helyeztünk.

Farmakológiai beavatkozások, és terjedő depolarizáció (SD) kiváltása

A kísérletek kezdeti fázisában 15 perces időközönként 2-3 SD-t váltottunk ki, majd a *caudalis* koponyaablakra paxillint (BK csatorna gátló, aCSF-ben oldva, 500 nM koncentrációban, n=6) vagy nimodipint (L-típusú VGCC gátló, 0,1 % DMSO-t tartalmazó aCSF-ben oldva, 100 μ M;³⁰⁷ n=5) mostunk. A paxillin koncentrációjának kiválasztásához előkísérleteinkben korábbi irodalmi adatok alapján 100, 500 és 1000 nM koncentrációjú oldatokat teszteltünk.¹⁴⁰ A preparátumot az anyagokkal 20 percig inkubáltuk, majd a kísérletek további szakaszában a csatornablokkolókat tartalmazó oldatokat 10 percenként frissítettük a koponyaablakban. Kontroll kísérleteinkben az agyfelszín 10 percenként aCSF-fel mostuk át (n=4). Kontrollnak tekintettük továbbá a paxillinnel és nimodipinnel kezelt állatokból a farmakológiai kezelések megkezdése előtt kiváltott SD-eket.

Az *rostralis* koponyaablakban az SD-k kiváltásához 1 M KCl-el átitatott papírvattát helyeztünk a kérgi felszínre, amit közvetlenül minden egyes SD kialakulása után eltávolítottunk, majd az agyfelszín aCSF-el öblítettük. Néhány esetben (n=4) a papírvattát a koponyaablakban hagytuk, így biztosítva az SD-k közötti alap $[K^+]_e$ fokozatos emelkedését a regisztráló ablakban. Ezekben a kísérletekben határoztuk meg a lehetséges összefüggést az emelkedő alap $[K^+]_e$, az SD és a kapcsolódó CBF változás jellegzetességei között.

Adatgyűjtés, és az eredmények értékelése

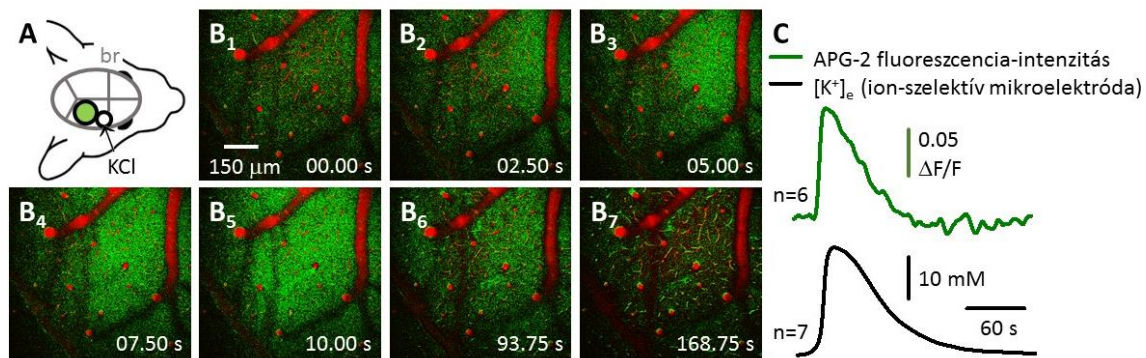
Az APG-2 fluoreszcenciájának intenzitásváltozását egy ImagePro-Plus-ban írt macro segítségével értékeltük (Media Cybernetics, Rockville, MD, U.S.A.) (4.1. fejezet). Az intenzitásértékeket a parenchyma területére helyezett $15 \times 15 \mu\text{m}$ -es ROI-kból nyertük, és azokat az idő függvényében ábráztuk. A ROI-k mérete megfelelt a K^+ -szenzitív mikroelektródák hegyének átmérőjének. Az érátmérőváltozásokat ImageJ programban becsültük meg (National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.). Az első SD-vel (SD1) járó változásokat a későbbi, visszatérő (rSD) eseményektől külön értékeltük (4.2. fejezet). A rodamin-dextránnal feltöltött piális és penetráló arteriolákat, valamint a parenchymában futó venulákat a két-foton mikroszkóppal felvett z-stack képsorok 3D rekonstrukcióján azonosítottuk (6.3.3. ábra, A-B panel). A 3D képrekonstrukciókat az ImageJ saját 3D Viewer-ének segítségével, 1.5i Java-val 1.6.0_24 (64 bit) hoztuk létre. Az érátmérőméréshez a videók fókuszsíkjában látható penetráló arteriolák és venulák keresztmetszét, illetve a piális arteriolák hosszmetzeti képét választottuk ki. Az analízisbe bevont erek kiválasztásánál a következő szempontokat vettük figyelembe: (i) Az SD-t jelölő K^+ hullám az ér közvetlen szomszédságában a parenchymán teljes mértékben átvonult; (ii) A penetráló arteriolák alapátmérete 10 μm -nél nagyobb volt, hogy az ér összehúzódást a

pixelméretre való tekintettel (i.e. 1 μm) biztonsággal és elfogadható hibával mérni tudjuk; (iii) A kiválasztott penetráló arteriolák egy piális arteriola első rendű oldalágai voltak; (iv) A penetráló ér ideálisan szabályos keresztmetszetben látszott.

A számszerűsített adatokat átlag \pm stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, IBM Corp., U.S.A.). Az adatsorokat egyszempontos ANOVA-val, majd Fisher-féle post hoc teszttel, vagy egyoldali Pearson-féle korrelációs analízissel értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$). Az egyes adatsorokra alkalmazott statisztikai próbákat az eredményeket bemutató ábrák magyarázatában adjuk meg.

A terjedő depolarizációval járó káliumhullám két-foton mikroszkópiával láthatóvá tehető

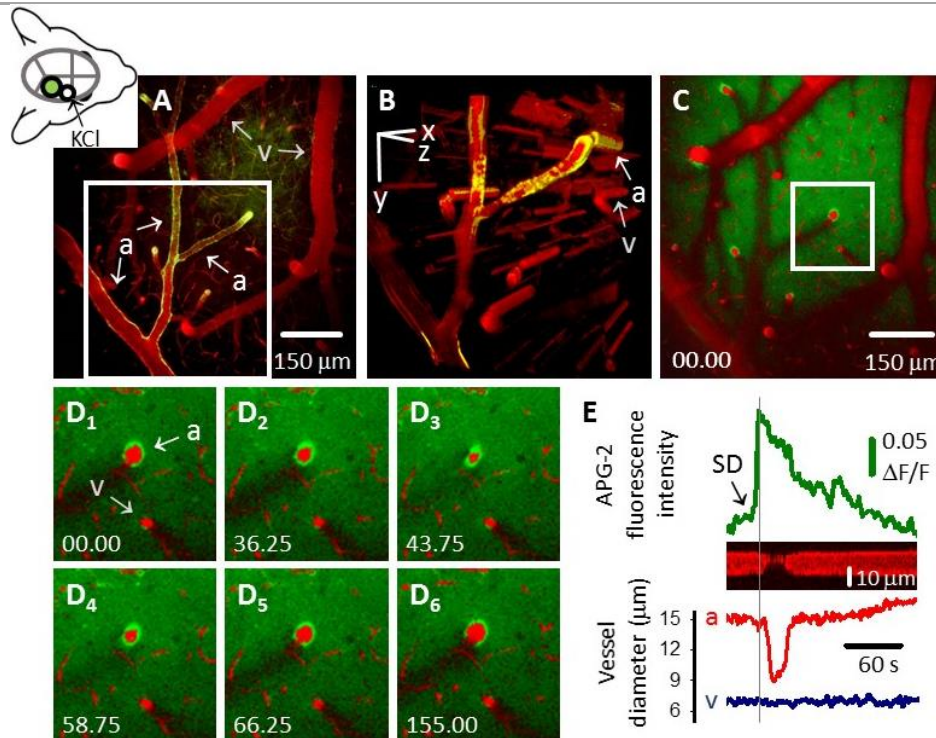
Az APG-2 fluoreszcencia-intenzitása minden egyes SD-vel lokálisan, meredeken emelkedett ($35,5 \pm 5,3 \text{ mM } [K^+]_e$ -nak megfelelő $14,00 \pm 0,03 \Delta F/F$ értékű maximális kitérés) (6.3.2. ábra), ami hullámszerűen, az SD-re jellemző $3,36 \pm 1,67 \text{ mm/min}$ terjedési sebességgel haladt át a látótéren. A kontroll kísérletben, az APG-2 elhagyásával, az SD kialakulását csak a jól kivehető érreakció bizonyította, parenchymális optikai jelintenzitás-változást nem tapasztaltunk. A kontroll kísérlet tehát igazolta, hogy az APG-2 kísérletekben felvett optikai jel valóban specifikus a K^+ indikátor festékre,²⁵ és ezen a hullámhosszon, az alkalmazott intenzitású megvilágítás és szűrés mellett nem ozmotikus duzzadásból származó IOS. Az APG-2 a K^+ -szenzitív elektródákhoz képest rövidebb ideig tartó, de nagyságrendileg egyező hosszúságú $[K^+]_e$ emelkedést jelzett, ($29,8 \pm 9,0$ vs. $57,7 \pm 17,8$ s) (6.3.2. ábra, C panel). Az eredményeket összegezve elmondható, hogy az APG-2 meggyőzően jelenítette meg az SD-vel járó $[K^+]_e$ hullámot.



6.3.2. ábra. Az APG-2 fluoreszcenciájának intenzitás-fokozódása megfelel az extracelluláris K^+ koncentráció meredek növekedésének terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) során. **A:** A preparátum sematikus rajzán a felvételek (B_{1-7}) készítéséhez használt koponyaablakot zöld szín jelzi. Az SD-kezt a kisebb körrel jelölt, közvetlenül a bregma (br) mögött kialakított, *rostralis* koponyaablakból váltottuk ki 1 M KCl-al. **B₁₋₇:** A hamis-színezésű, a képi kontraszt fokozásával nyert két-foton mikroszkópos felvételek tanúsága szerint az APG-2 fluoreszcencia-intenzitása (zöld) az SD megjelenésével erősödött. A reprezentatív SD a jobb felső sarokból, *rostro-caudalis* irányból terjedt a látótérbe. Az APG-2 optikai jelét a zöld csatornán háttérkivonással emeltük ki. Az agykérgi érhálózat az intravaszkuláris rodamin-dextrán (piros) révén jelenik meg. A felvételek 50-55 μm -es kérgi mélységből származnak. **C:** Az ion-szenzitív mikroelektrodával mért, SD-re jellemző $[K^+]_e$ változás (fekete vonaldiagram, 7 SD esemény átlaga) igazolja, hogy a két-foton mikroszkópos képsorokra tetszőlegesen elhelyezett érdeklődési területekről (ROI) nyert APG-2 optikai jel (zöld vonaldiagram, 6 SD esemény átlaga) megfelel az elektrofiziológiai regisztrátumoknak.

A terjedő depolarizációt kísérő érválasz egér agykéregben

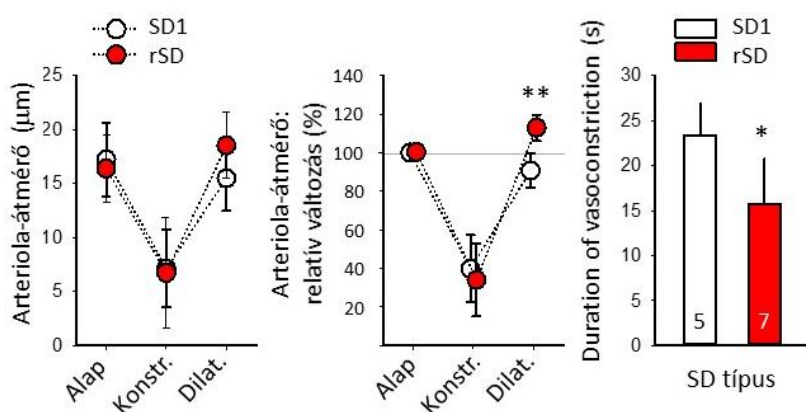
Az SD terjedésére csak az arteriolák válaszoltak kezdeti, markáns konstrikciónal, ugyanakkor a venulák átmérője megtartott maradt (6.3.3. ábra). Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy az arteriolák átmérőcsökkenése aktív vazokonstriktió eredménye, és nem az idegsejtek vagy a dendritek SD-vel összefüggő duzzadása következtében kialakuló fizikai kompresszió következménye.^{311,372,425}



6.3.3. ábra. Az első terjedő depolarizációval (SD1) jelentkező, gyors $[K^+]_e$ emelkedés hullámfrontja időben és térben egybeesik a penetráló arteriolák összehúzódásával. **A:** A jobb felső sarokban a preparátum sematikus ábrája segíti a B-D paneleken bemutatott képek orientációját. A képalkotáshoz használt koponyaablak zöld színű. A két-foton mikroszkópos felvétel egy reprezentatív, 130 képkockából álló z-projekciót mutat be a kéreg 200 μm mélységéről. Az érhálózatot az intravaszkuláris rodamin dextrán emeli ki (piros), illetve az abluminális felszínre kirakódott APG-2 határolja (zöld/sárga). Az „a”-val jelölt nyilak arteriolákra, a „v”-vel jelöltek venulákra mutatnak. A venulák tipikusan APG-2 kontúrától mentesek. A fehér kerettel kiemelt terület rekonstrukciója a B panelen látható. **B:** A különböző típusú erek azonosítását a két-foton mikroszkóppal a pásztázott, 200 μm vastag agykérgi szövetben háromdimenziós z-stack rekonstrukció segíti. Az „a” jelű nyíl egy penetráló arteriolát, a „v” jelzésű egy mellette futó venulát jelöl, melyek a C-D₁₋₆ paneleken kiemelve, keresztmetszeti síkban jelennek meg. **C:** Az érátmérők becsléséhez használt képsor első felvétele. A hamis-színezésű, a képi kontraszt fokozásával nyert, reprezentatív két-foton mikroszkópos felvétel az agykéreg 50-55 μm mélységében készült. A parenchymában felhalmozódott APG-2 zöld, az ereket megjelenítő rodamin dextrán piros színű. A felvétel fehér keretes részletét a D₁₋₆ paneleken nagyítottuk ki. **D₁₋₆:** A képsorozat egy penetráló arteriola SD1-re adott összehúzódását mutatja be; a szomszédos kis venula átmérője változatlan maradt. **E:** A piros vonaldiagram és a kimográf a penetráló arteriola konstriktóját; a kék vonaldiagram az SD1-re nem reagáló venula átmérőjét jeleníti meg. A zöld regisztrátum az APG-2 fluoreszcencia-intenzitásának változását mutatja be az érátmérő-változással együtt. A kimográf FIJI-ben készült. Először a szöveti struktúrák elmozdulását a mozgáskövetésre írt Template Matching plugin alkalmazásával korrigáltuk,¹⁸⁸ majd az érkeresztmetszetre illesztett vonal mentén KymographBuilder plugin (DOI 10.5281/zenodo.591877) segítségével rajzoltuk meg a kimográfot.

Az SD1 és rSD-k közötti különbségek értékeléséhez a penetráló arteriolák válaszreakcióját vettük alapul. Az SD1 csupán vazokonstriktiót, azaz érátmérő-csökkenést váltott ki ($17,2 \pm 3,4 \mu\text{m}$ -ről $7,1 \pm 3,6 \mu\text{m}$ -re) (6.3.4. ábra). A későbbi rSD-k esetén a kezdeti érösszehúzódsást ($16,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$ -ről $6,7 \pm 5,1 \mu\text{m}$ -re) hosszabban elhúzódó értágulat követte ($18,5 \pm 3,2 \mu\text{m}$ -re) (6.3.4. ábra). A vazokonstriktió mértéke hasonló volt az SD1 és rSD-kre nézve, de annak időtartama rSD-k esetén szignifikánsan rövidebbnek bizonyult ($15,7 \pm 5,1$ vs. $23,4 \pm 3,5$ s) (6.3.4. ábra).

Az érátmérő-változásokkal összefüggő CBF változásokat egy másik kísérleti csoportban lézer-Doppleres áramlásméréssel igazoltuk (6.3.5. ábra, C panel). Összességében az SD-hez társuló CBF válaszreakció kezdetben átmeneti hipoperfúziót jelölt (SD1: $100,0 \pm 0,8$ %-ról $74,0 \pm 9,1$ %-ra, rSD: $60,4 \pm 5,1$ %-ról $47,4 \pm 11,7$ %-ra). Visszatérő SD-k (rSD) után a hipoperfúziót hiperémia követte, melynek csúcsa az SD1-okozta oligémiáról indulva $77,9 \pm 8,1$ %-ot ért el, és az áramlásfokozódás átlagban $99,1 \pm 61,7$ másodpercig maradt fenn. Az egér agykéregre vonatkozó korábbi kutatások is hasonló eredményre jutottak. LASCA módszerrel az rSD után gyors, rövid hipoperfúziót, majd hiperémiát mértek,^{15,344} illetve két-foton mikroszkópiával mutatták meg a penetráló arteriolák elsődleges összehúzódsását, majd az ezt követő tágulatát.³⁹³

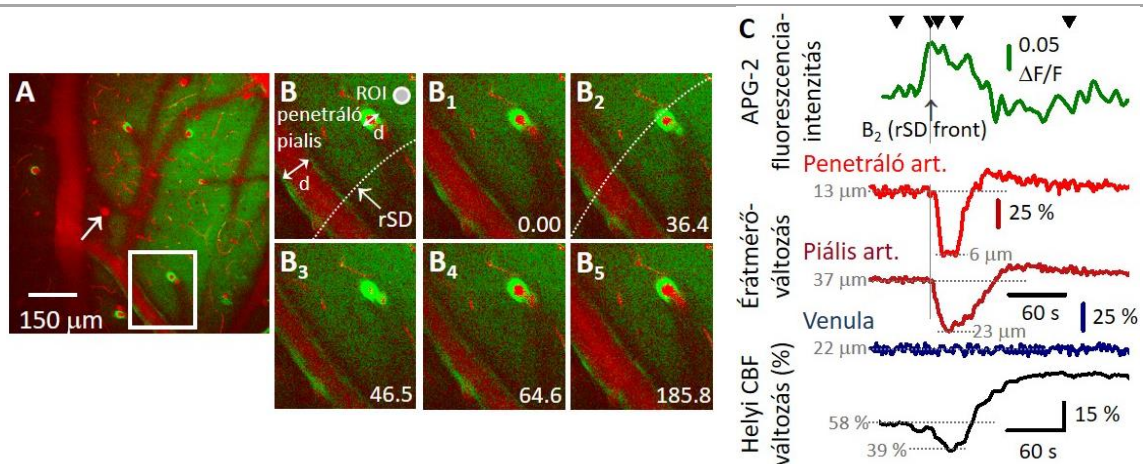


6.3.4. ábra. A penetráló arteriolák átmérőjének abszolút és relatív változása, valamint az érösszehúzódsás időtartama az első (SD1) és visszatérő terjedő depolarizációkra (rSD) nézve. Az eredményeket átlag \pm stdev formában adtuk meg. Az értékelésbe bevont arteriolák számát az oszlopdiagramon jelöltük. A statisztikai analízishez egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) használtunk ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$).

Az agykérgi arteriolák összehúzódsása terjedő depolarizáció során az $[K^+]_e$ gyors emelkedésével egyidejűleg valósul meg

Az arteriolák konstrikciója térben és időben pontosan akkor jelentkezett, amikor az APG-2 jelintenzitás-növekedés egy adott ér közvetlen szomszédságába ért, így szoros csatolást állapítottunk meg az $[K^+]_e$ markáns emelkedése és a piális és penetráló arteriolák konstrikciója között (6.3.5. ábra). Az arteriolák összehúzódsása lényegében akkor indult meg, amikor az SD-re jellemző, meredek $[K^+]_e$ emelkedés elérte a maximumát (6.3.5. ábra, C panel), tehát a vazokonstriktiót külső stimulus, a magas $[K^+]_e$ váltotta ki. Ez a megállapítás azért lényeges, mert egy másik munkacsoport az erek belső konduktanciáját (az endothél sejtek egymás közötti kommunikációja réskapcsolatokon keresztül,¹⁹⁰ tette felelőssé az SD-vel járó CBF változás terjedéséért.³⁰ Véleményüket arra alapozták, hogy a CBF változás hiperémiás komponensének hátterében álló piális arteriola-tágulat gyorsabban terjedt, mint az SD maga.³⁰ Ezzel összhangban először izolált agykérgi penetráló arteriolákon, majd később az agyi mikrokeringésre összpontosító *in vivo* kísérletekben is megmutatták, hogy a perivaszkuláris K^+ koncentráció mérsékelt emelkedése endothél-függő retrográd vazodilatációt okoz.^{182,238} Az említett kísérletekben

azonban a stimulusként alkalmazott perivaskuláris K^+ koncentráció-emelkedés a klasszikus neurovaszkuláris csatolásra jellemző, alacsony, vazodilatátor (<10 mM) tartományban maradt. Eredményeink azt mutatják, hogy az SD-hez csatolt CBF változás korai, vazokonstriktív eleme közvetlenül a magas $[K^+]_e$ függvénye, és nem előzi meg az SD-re jellemző K^+ hullámot sem térben, sem időben. A látszólagos ellentmondás hátterében a következő jelenségek állhatnak. Az arteriolák saját konduktanciája nyilvánvalóan az erek lefutását követi, míg az SD – terjedési irányát tekintve – független az érhálózat szerkezetétől, és az ép keringésű *lissencephal* rágcsáló agykérgen egyenletesen terjed tova. A vaszkuláris konduktancia valószínűleg nem érhető tetten, ha az SD terjedésének iránya nem párhuzamos egy adott piális arteriolával, vagy ellentétes a vaszkuláris konduktancia irányával. A másik, megfontolásra érdemes körülmény, hogy az arteriolák saját konduktanciáját bizonyító vizsgálatok stimulusként mérsékeltén növelték a $[K^+]_e$ -t (5-10 mM), ami értágulatot vont maga után.^{182,238} Saját munkánk során azonban az SD-vel drasztikus $[K^+]_e$ emelkedést hoztunk létre (~35 mM), mellyel vazokonstriktió járt. Ezek a drasztikus változások kellően meghatározóak lehetnek ahhoz, hogy elfedjék a háttérben finomabban működő érátmérő-szabályozó mechanizmusokat, mint például a vaszkuláris konduktancia. Következésképpen feltételezzük, hogy az SD-vel járó, kezdeti vazokonstriktiót az SD hullámfrontján jelentősen megemelkedő $[K^+]_e$ váltja ki.

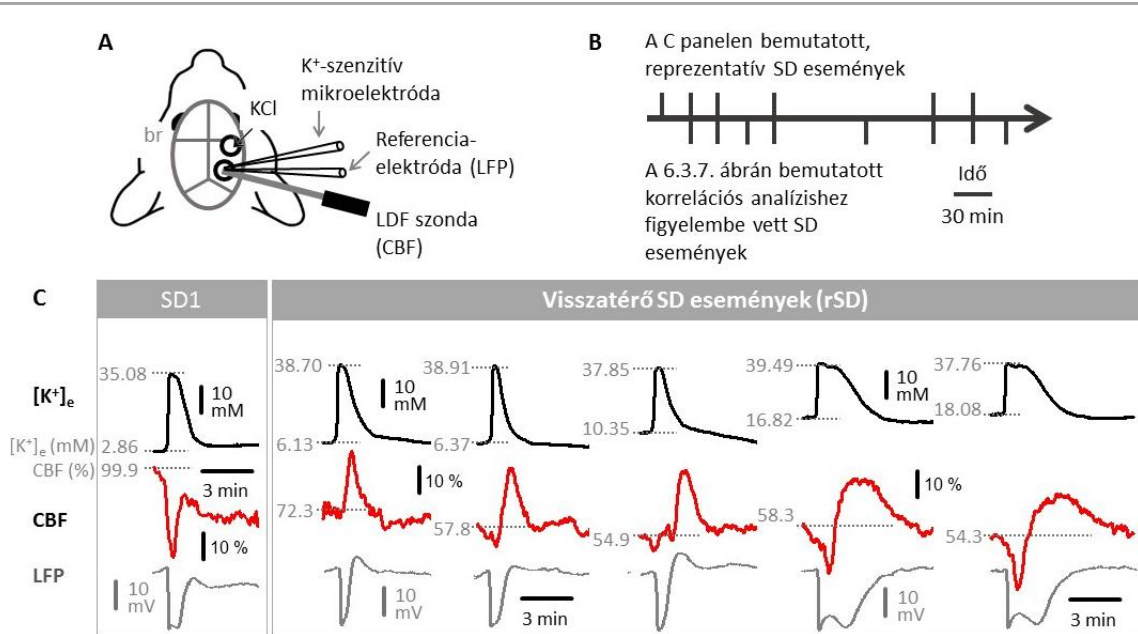


6.3.5. ábra. A visszatérő terjedő depolarizációval (recurrent spreading depolarization, rSD) jelentkező, gyors $[K^+]_e$ emelkedés hullámfrontja időben és térben egybeesik a piális és penetráló arteriolák összehúzódásával. **A:** Az érátmérők becsléséhez használt képsor első felvétele. A hamis-színezésű, a képi kontraszt fokozásával nyert, reprezentatív két-foton mikroszkópos felvétel az agykéreg 50-55 μm mélységében készült. A parenchymában felhalmozódott APG-2 zöld, az ereket megjelenítő rodamin dextrán piros színű. A felvétel fehér keretes részletét a B₁₋₅ paneleken nagyítottuk ki. A nyíl arra a venulára mutat, amelynek az átmérő-változását a C paneleken ábrázoltuk. **B:** A hosszmetsetben látszó piális és a keresztmetsetben kirajzolódó penetráló arteriola átmérőjét (d) úgy mértük meg, hogy a kiválasztott érszakaszokhoz és a parenchymára helyezett érdeklődési területhez (ROI) az rSD APG-2-vel megjelenített K^+ hullámfrontja (szaggatott fehér vonal) egyszerre érkezzon. Ebben az elrendezésben jellemezni tudtuk az $[K^+]_e$ emelkedés és az érválaszok időbeli viszonyát. **B₁₋₅:** A képsorozat egy reprezentatív piális és egy penetráló arteriola rSD-re adott érreakcióját mutatja be. A B₁₋₃ felvételeken az érösszehúzódás, míg a B₄₋₅ képeken a későbbi értágulat látszik. **C:** A zöld vonaldiagram a B paneleken jelzett ROI-ból nyert APG-2 jelintenzitás-változást ábrázolja. A piros vonaldiagramok a csatolt arteriolaátmérő-változásokat, a kék az A paneleken kijelölt venula reakcióját mutatja be. A lefelé mutató fekete háromszögek a B panel képeinek felvételét jelölik. A fekete vonaldiagram egy reprezentatív lokális agyi vérátáramlási választ ad meg, melyet lézer-Doppleres áramlásméréssel regisztráltunk egy másik kísérletben.

Munkánk technikai korlátja az volt, hogy sem az ion-szelektív mikroelektroda, sem az APG-2 fluoreszcenciáján alapuló képalkotás nem biztosít olyan térbeli felbontást, amely lehetővé tenné a perivaszkuláris tér elkülönítését az idegszöveti interstíciumtól. Munkahipotézisünkben azt fogalmaztuk meg, hogy az asztrociták közvetítik a K^+ szignált az arteriolák felé úgy, hogy a felszaporodott extracelluláris K^+ -ot felveszik, és a perivaszkuláris térbe juttatják. Az asztrociták részvétele a vazoaktív K^+ eltávolításában (asztrocita „szifon” funkció)²⁰⁵ feltételezhetően időigényes, ami magyarázatot adhat arra, hogy az SD-vel járó, kezdeti vazokonstrikció akkor kezdődik meg, amikor az $[K^+]_e$ meredek emelkedése már elérte csúcsertékét (6.3.3. és 6.3.5. ábra).

A terjedő depolarizációra válaszul jelentkező kezdeti hipoperfúzió mértéke az $[K^+]_e$ függvénye

Az akut agyi sérülések az $[K^+]_e$ mérsékelt emelkedését vonják maguk után, majd percekkel később spontán SD jelenik meg.^{153,158} Az iszkémia létrejöttével az $[K^+]_e$ 3 mM-ról fokozatosan 10 mM-ra nő, ami kedvez az SD kialakulásának.^{153,158} Kísérleteink egy részében azt vizsgáltuk, hogy a fokozatosan emelkedő alap $[K^+]_e$ önmagában, az iszkémia más komponenseitől (pl. lakát acidózis, korlátozott glükóz kínálat, ATP hiány) függetlenül miként befolyásolja a kiváltott SD tulajdonságait.



6.3.6. ábra. Az $[K^+]_e$ és a terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) csatolt kezdeti hipoperfúzió közötti összefüggés. **A:** Kísérleti elrendezés az elektrofiziológiai adatregisztrációhoz. A regisztrátumokat a *caudalis* koponyaablakból vettük fel, SD-ke-t a rostralis ablakban váltottuk ki topikális KCl adagolással. **B:** A reprezentatív kísérlet idővonalán a részletesen értékelt visszatérő SD eseményeket (rSD) függőleges vonalak jelzik. Az idővonalon felfelé mutató vonalak a C panelen látható rSD-k, a lefelé mutató vonalak a 6.3.7. ábra korrelációs analízisébe bevont rSD-k. **C:** Az rSD-k (szürke), az SD-vel járó $[K^+]_e$ emelkedés (fekete) és a csatolt lokális agyi vérátáramlási válasz (cerebral blood flow, CBF) (piros) kinetikája az alap $[K^+]_e$ függvényében (fekete vonaldiagramok első szegmense) módosul. Rövidítés: LDF: lézer-Doppleres áramlásmérés (laser-Doppler flowmetry) LFP: helyi mezőpotenciál (local field potential), SD1: a kiváltott SD események sorában az első.

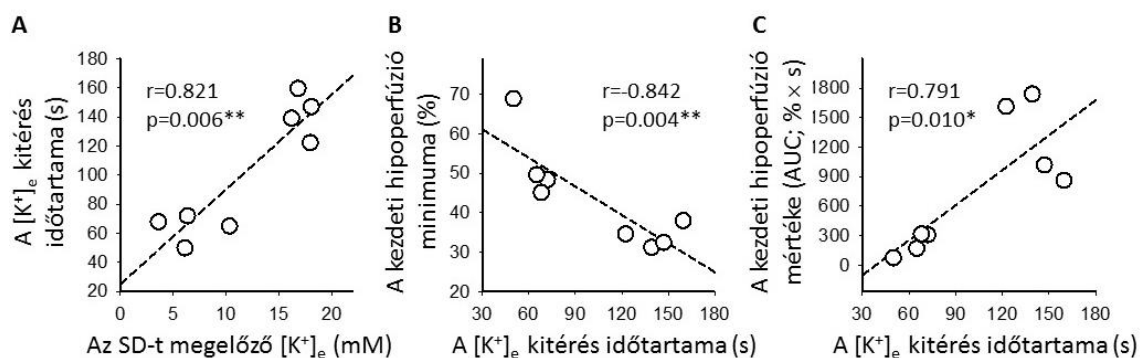
A $[K^+]_e$ és az SD-t kísérő CBF változás kezdeti hipoperfúziós komponense közötti összefüggés kvantitatív vizsgálatát az elektrofiziológiai mérések tették lehetővé. A változók közötti szoros kapcsolatot egy reprezentatív kísérlet révén ismertettjük (6.3.6. és 6.3.7. ábra). A választott kísérlet több szempontból is ideálisnak bizonyult: (i) Az ismétlődő rSD-k a keringését tekintve ép agykéregben egyre emelkedő alap $[K^+]_e$ mellett alakultak ki (2,86 mM-ról 18,08 mM-ra)

(6.3.6. ábra) – Az alap $[K^+]_e$ grádiens a fiziológias nyugalmi szintről indulva a sérült agyszövetre jellemző, magas értéket vett fel, de mindvégig a vazodilatátor koncentrációs tartományban maradt; (ii) A mikroelektrodák és a lézer-Doppler szonda egymáshoz képest rögzített helyzete lehetővé tette, hogy a $[K^+]_e$ és a CBF viszonyának változását SD-ről SD-re pontosan ugyanabból a szöveti pozícióból értékeljük; (iii) A tervezett korrelációs vizsgálatokhoz az adott kísérletről kellően magas számú rSD-t regisztráltunk és analizáltunk ($n=8$).

Az adatok értékelése igazolta, hogy a vizsgált tartományban az alap $[K^+]_e$ emelkedése és a nyugalmi CBF között nem állt fenn összefüggés (egyoldali Pearson-féle korrelációs analízis: $r=0,171$; $p=0,342$). A növekvő alap $[K^+]_e$ azonban előre vetítette az SD-re jellemző $[K^+]_e$ kitérés időbeli elhúzódását ($r=0,821$; $p=0,006^{**}$) (**6.3.7. ábra, A panel**), igazolva az élő agyszelet preparátumban korábban leírt összefüggést.¹⁰⁶ Az alap $[K^+]_e$ emelkedése ugyanakkor nem befolyásolta a $[K^+]_e$ kitérés abszolút értékben kifejezett amplitúdóját ($r=0,580$; $p=0,132$). Az eredményekből levonható legfontosabb következtetés az, hogy a magas alap $[K^+]_e$ gátolja a visszatérést az SD-re jellemző $[K^+]_e$ kitérésből. Mivel az SD elnyúló időtartama – mely a $[K^+]_e$ kitérés hosszának megfelel – növeli az iszkémiás infarktus növekedésének esélyét,^{96,164} azt feltételezzük, hogy az SD-t megelőző, vagy az ismétlődő SD események közötti alap $[K^+]_e$ indikátora lehet, és fontos szerepet játszik az iszkémiás lézió súlyosbodásában.

Eredményeink megmutatták, hogy a $[K^+]_e$ kitérés növekvő hossza nagyobb mértékű kezdeti hipoperfúzióval esett egybe, melyet $[K^+]_e$ kitérés hossza és a hipoperfúzió minimumpontja, valamint AUC-je közötti pozitív korreláció jelzett (**6.3.7. ábra, B-C panel**). A $[K^+]_e$ kitérés csúcspontja és a hipoperfúzió mértéke között nem találtunk összefüggést (hipoperfúzió minimumpontjára nézve: $r=-0,147$; $p=0,364$; a hipoperfúzió AUC-re nézve: $r=0,282$; $p=0,249$).

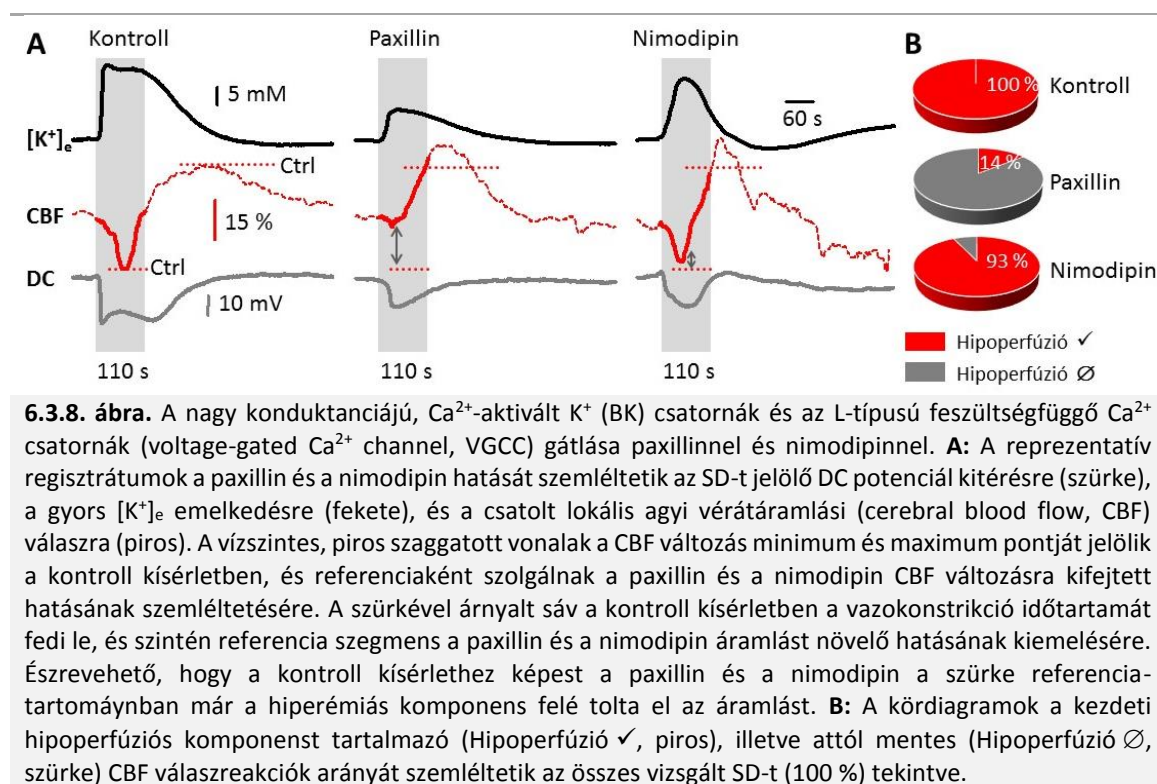
Az SD-vel összefüggésben jelentkező kezdeti hipoperfúzió leginkább az iszkémiás agykéregre jellemző, és a metabolikus stressz alatt lévő szövet túlélését veszélyezteti.¹⁷⁸ A nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase, NOS) gátlása magas $[K^+]_e$ mellett az SD megjelenésével a lokális szöveti perfúzió közvetlen esését okozta – ez a hirtelen perfúzió-csökkenés vált tejredő iszkémia néven ismertté.^{96,101} Kísérleteink új bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a $[K^+]_e$ önmagában, az ép keringésű kéregben is megszabhatja az SD-hez csatolt kezdeti hipoperfúzió mértékét, tehát a $[K^+]_e$ központi szerepet tölt be a hipoperfúzió szabályozásában.



6.3.7. ábra. Korrelációs vizsgálat az alap $[K^+]_e$ és a visszatérő terjedő depolarizációra (rSD) jellemző $[K^+]_e$ kitérés időtartama (A), a $[K^+]_e$ kitérés időtartama és a csatolt kezdeti hipoperfúzió mélysége (B), valamint a $[K^+]_e$ kitérés időtartama és a hipoperfúzió görbe alatti területe (area under the curve, AUC) (C) között. A statisztikai analízishez egyoldali Pearson korrelációs modellt alkalmaztunk ($n=8$; $p<0,05^*$ és $p<0,01^{**}$)

A vazokonstriktió létrehozásában a BK csatorna és az L-típusú VGCC vesz részt

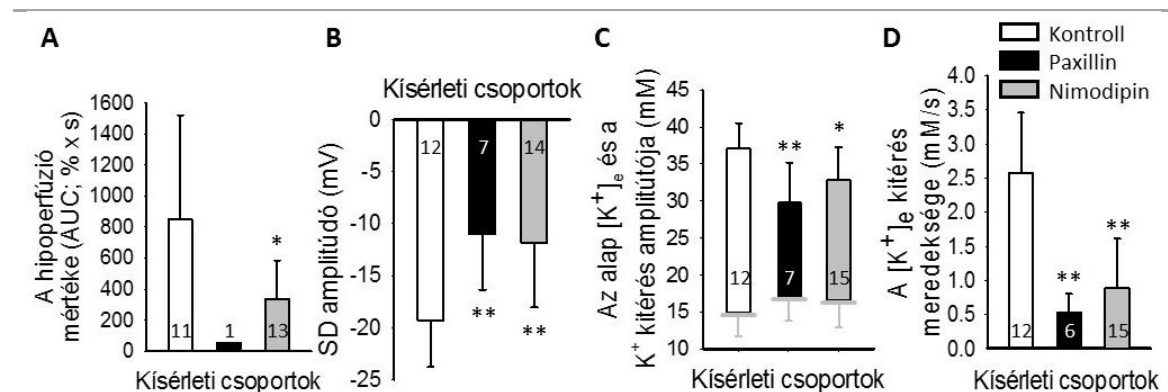
A munka további részében arra kerestük a választ, hogy a magas $[K^+]_e$ milyen szignalizációs útvonalon keresztül hozza létre az érösszehúzódot. Hipotézisünk a BK csatornák és az L-típusú VGCC szerepét valószínűsítette (6.3.1. ábra). Elképzelésünk igazolására a két csatorna szelektív blokkolóját, a paxillint és a nimodipint mostuk az agyfelszínre. Választásunk a következők miatt esett a két vegyületre. A paxillin 1-2 μM -os koncentrációban hatékonyan védte ki a fokozott neuronális aktivitásra válaszul létrejövő arteriola-tágulatot élő agyszelet preparátumban, és a bajuszingerléssel kiváltott funkcionális hiperémiát rágszáló szomatonszezoros kéregben.^{140,201,206} Az említett tanulmányok szerint a BK csatornák a neurovaszkuláris csatolás során központi szerepet töltenek be az értónus szabályozásában. A nimodipin intravénás adagolása enyhítette az SD-hez társuló terjedő iszkémiát, melyet a magas $[K^+]_e$ és a szövetből felszabaduló NO megkötésének kombinációjával értek el.^{100,101} Később izolált *arteria cerebri media* preparátumra mosva a nimodipin kivédte a magas $[K^+]_e$ -al indukált vazokonstriktiót is.⁴¹³ A biztató eredmények birtokában terveztük meg a paxillin és a nimodipin alkalmazásán alapuló kísérleteinket.



A farmakológiai kísérletekből gyűjtött adatok értékelése az SD-t kísérő CBF változás kezdeti hipoperfúziós elemére koncentrált. A csatornablokkolóknak csak az rSD eseményekre gyakorolt hatását vizsgáltuk, mert az SD1 események a farmakológiai kísérletek első, kezelés szempontjából kontroll szakaszára estek. Ahhoz, hogy a csatornablokkolók várhatóan hipoperfúzió-csökkentő hatása látható legyen, a kontroll körülmények között egy jelentős hipoperfúzió jelenti az ideális referenciát. Fentebb bemutattuk, hogy magasabb alap $[K^+]_e$ mellett az SD-hez társuló kezdeti hipoperfúzió kifejezetebb (6.3.6. és 6.3.7. ábra). Ezeket a megállapításokat figyelembe véve a farmakológiai adatelemzés olyan rSD eseményekre korlátozódott, amelyeket 10 mM-nál magasabb alap $[K^+]_e$ előzött meg. Ugyanezt a logikát követve lényegesnek tartottuk, hogy az rSD-t megelőző alap $[K^+]_e$ az egyes kísérleti csoportokra nézve közel azonos legyen. Az adatok értékelése azt bizonyította, hogy ez a kritérium teljesült ($[K^+]_e$: $16,5 \pm 3,6$ vs. $17,0 \pm 3,2$ vs. $14,9 \pm 3,1$ mM, nimodipin vs. paxillin vs. kontroll; egyszempontos ANOVA: $f=1,175$; $p<0,322$).

Az SD-hez kapcsolódó CBF változás kezdeti hipoperfúziós komponensét a paxillin és a nimodipin is jelentősen gátolta (6.3.8. ábra). Különösen a paxillin bizonyult hatékonynak, hiszen 7-ből 6 esetben nem alakult ki a kezdeti hipoperfúzió (6.3.8. ábra, B panel). Bár a nimodipin hatása nem volt ennyire szembetűnő, a hipoperfúzió mértékét (AUC) a nimodipin is a kontroll érték felére csökkentette (6.3.9. ábra, A panel). Eredményeink alátámasztják a munkahipotézisünket (6.3.1. ábra), és rávilágítanak a BK csatornák és az L-típusú VGCC szerepére az SD-t követő kezdeti vazokonstriktációban. Érdekes megjegyezni, hogy míg az eddig elvégzett vizsgálatokban a paxillin a mérsékelt $[K^+]_e$ emelkedéssel (<10 mM) összefüggő vazodilatációt gátolta,¹⁴⁰ addig saját eredményeink azt mutatják, hogy a paxillin a magas $[K^+]_e$ -al (<20 mM) kiváltott hipoperfúzió kialakulását gátolja. A nimodipin hipoperfúziót antagonizáló hatása az SD során megfelel azoknak a klinikai megfigyeléseknek, melyek szerint javította a felépülés esélyét aneurizma ruptúrát követő SAH-ból.³⁸⁰ A nimodipin előnyös hatása a DCI előfordulásának és súlyosságának csökkentésével érvényesült, és nem az angiográfiával igazolt tartós vazospazmus gátlása révén.^{6,119,292}

A CBF változásra gyakorolt hatása mellett a paxillin és a nimodipin csökkentette az rSD amplitúdóját is (11,8±6,2 vs. 11,00±5,3 vs. 19,3±4,5 mV; nimodipin vs. paxillin vs. kontroll (6.3.9. ábra, B panel). Végül mindkét csatornablokkoló gátolta az SD-vel a $[K^+]_e$ gyors növekedését, amit a kisebb relatív amplitúdó (16,4±6,5 vs. 12,7±7,5 vs. 22,2±2,7 mM; nimodipin vs. paxillin vs. kontroll), a kisebb abszolút amplitúdó (32,9±4,4 vs. 29,7±5,4 vs. 37,0±3,5 mM; nimodipin vs. paxillin vs. kontroll), és a lassab ütemű $[K^+]_e$ emelkedés bizonyított (a görbe meredeksége: 0,89±0,72 vs. 0,54±0,27 vs. 2,57±0,89 mM/s; nimodipin vs. paxillin vs. kontroll) (6.3.9. ábra, C-D panel).



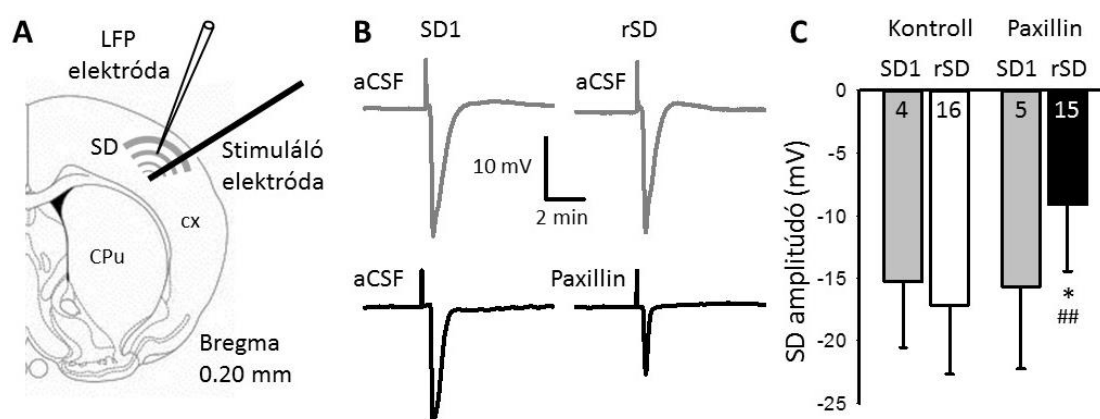
6.3.9. ábra. A paxillin és a nimodipin hatásának kvantitatív analízise. **A:** A farmakológiai kezelések szignifikánsan csökkentették a terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) csatolt kezdeti hipoperfúzió mértékét, melyet a görbe alatti területtel (area under the curve, AUC) jellemeztünk ($f=3,802$; $p<0,038^*$). A paxillinnél jelölt 1-es elemszám annak köszönhető, hogy a paxillin kezelés mellett csak egy esetben jött létre kezdeti hipoperfúzió. **B:** A csatornablokkolók hatékonyan csökkentették az SD amplitúdóját ($f=7,683$; $p<0,003^{**}$). **C:** Az SD-t megelőző $[K^+]_e$ mindhárom csoportban hasonló átlagérték körül mozgott (az oszlopok szürke vonallal megerősített alapja, és a szórást jelölő hibavonal; $f=1,175$; $p<0,322$). A paxillin és a nimodipin csökkentette a $[K^+]_e$ kitérés relatív amplitúdóját (egyszempontos ANOVA: $f=6,702$; $p<0,004^{**}$). **D:** A $[K^+]_e$ kitérés sebességét, melyet a görbe meredekségével jellemeztük, mindkét csatornablokkoló csökkentette ($f=22,791$; $p<0,0001^{**}$).

Az adatokat minden oszlopdiagramon átlag±stdev formában adtuk meg. Az értékelésbe bevont SD-k számát az egyes oszlopokon jelöltük. A statisztikai analízishez egyszempontos ANOVA-t használtunk, melyet a csoportpárok összehasonlítására Fisher-féle post hoc teszt követett ($p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$).

Az agyseleteken végzett kísérletek eredményei alátámasztották az *in vivo* méréseket. A paxillin csökkentette az rSD amplitúdóját az azonos szeletben, kontrollként aCSF rámosása mellett kiváltott SD1-hez képest (-9,1±5,3 vs. -15,7±6,6 mV), és más szeletekben aCSF-ben kiváltott

rSD-khez képest is ($-9,1 \pm 5,3$ vs. $-17,2 \pm 5,5$ mV) (6.3.10. ábra). Azokban az agyszeletekben, melyeket nem kezeltünk paxillinnel (i.e. aCSF kontroll), az rSD-k amplitúdója nem különbözött az SD1 amplitúdójától ($-17,2 \pm 5,5$ vs. $-15,3 \pm 5,3$ mV) (6.3.10. ábra).

A paxillin és a nimodipin SD-re kifejtett gátló hatása felveti a kérdést, hogy a hipoperfúzió mérséklését közvetlenül, vagy az SD modulálásán keresztül okozzák. Az SD-t jelző DC potenciál kitérés csökkenése szorosan összefügg az SD-vel járó $[K^+]_e$ csökkenésével, hiszen a DC potenciál változását döntően a $[K^+]_e$ változása szabja meg.¹⁵⁸ A paxillin kezeléssel kapott eredmények azt az új elképzelést vetik fel, hogy az SD során a K^+ kiáramlása az idegsejtekből részben BK csatornákon keresztül valósul meg. A kilencvenes évekből származó tanulmányok whole-cell patch-clamp technikával bizonyították, hogy az ionáramok az idegsejtek membránján keresztül az SD felfutásakor nem-szelektív $Na^+(Ca^{2+})/K^+$ konduktanciát jeleznek, ami számos ioncsatorna megnyílása révén jelentős K^+ kiáramlást jelent.^{72,73} Ugyan a befelé egyenirányító és a kései kifelé egyenirányító K^+ csatornákat blokkoló tetraetil-ammónium, vagy a befelé egyenirányító és A-típusú K^+ csatornákat blokkoló 4-amino-piridin kezelések nem gátolták az SD-t teljesen, mégis felfedték a felsorolt csatornák részesedését az SD létrejöttében.^{2,351} A K^+ metabolikus stressz esetén ATP-szenzitív K^+ csatornákon keresztül is elhagyhatja az idegsejteket.³⁵¹ Bár a leírt nem-szelektív $Na^+(Ca^{2+})/K^+$ konduktanciák valószínűleg számottevő részt vállalnak az SD iniciálásában, a BK csatornák további, jelentős szerepére tanulmányunk világított rá először.



6.3.10. ábra. A nagy konduktanciájú, Ca^{2+} -aktivált K^+ (BK) csatornák farmakológiai gátlása paxillinnel *in vitro* élő agyszelet-preparátumon. **A:** Az agyszeleteken elektromos ingerléssel váltottunk ki terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD), és DC módban vezettünk el agykérgi mezőpotenciált (local field potential, LFP). **B:** A reprezentatív regisztrátumok azt szemléltetik, hogy kontroll körülmények között (aCSF) a visszatérő SD-k (rSD) lefutása egyezik a referenciaként használt első SD-vel (SD1) (szürke), míg 500 nM paxillin hozzáadásával az rSD-k amplitúdója csökken (fekete). Az ábrázolt rSD-k az adott agyszeletben a harmadik vagy negyedik kiváltott esemény volt, és kb. 50 perccel követte a referenciaként használt SD1-et. **C:** Az SD-t jelölő, negatív DC potenciál kitérés amplitúdója. Az SD1-et a kontroll és a paxillinnel kezelt szeleteken is aCSF inkubáció mellett váltottuk ki, és referenciának tekintettük. A paxillint 8 perccel az rSD-k kiváltása előtt mostuk a szeletekre. Az adatokat átlag \pm szórás formában ábrázoltuk. Az elemszámot az oszlopokon adtuk meg. A statisztikai értékelést egyszempontos ANOVA-val és Fisher-féle post hoc teszttel végeztük ($p < 0,05^*$ vs. SD1 pár; $p < 0,01^{##}$ vs. kontroll rSD). Rövidítések: CPu: caudate putamen, cx: cortex cerebri.

A paxillin gátló hatását az általunk használnál (500 nM) nagyobb, 1 μ M-os koncentrációban specifikusnak találták az asztrocita-végtalpak BK csatornáira vonatkozóan, az idegsejtek BK csatornáinak érintettsége nélkül.¹⁴⁰ Ha kísérleteinkben a paxillin valóban szelektíven az asztrocita BK csatornákon hatott, akkor a BK csatornák nem csak a perivaszkuláris végtalpakon, hanem az asztrociták felszínén, az idegsejtek közötti nyúlványokon is előfordulhattak, és így járulhattak hozzá az SD-re jellemző $[K^+]_e$ emelkedéshez. Mégsem zárható ki az a lehetőség, hogy a paxillin az alacsony koncentráció ellenére kísérleteinkben neuronális BK csatornákat is gátolt. A BK csatornák ugyanis az idegsejtek szómáját és dendirrhálózatát gazdagon borítják, az idegsejtek ingerelhetőségét szabályozzák,²²¹ és hipoxia alatt aktiválásuk csökkenti az idegszövet érzékenységét az SD-re.¹⁷² A neuronális BK csatornák blokkolása szisztémásan adagot paxillinnel (2,2 μ g=testsúlykilogramm) továbbá hatékonyan gátolta a kísérletesen kiváltott görcsaktivitást,³⁴⁰ amely az SD-hez mechanisztikusan legközelebb álló kórélettani jelenség az agyban, és az SD-vel együttesen is előfordul akut agysérülések esetén.^{105,123} Mindezek alapján a paxillin a hipoperfúzió gátlását elérhette indirekt úton, a neuronális BK csatornákon kiáramló K^+ szintjének csökkentésével, vagy direkt módon, az asztrocita-végtalpak BK csatornáit blokkolva. Ha azonban figyelembe vesszük, hogy a paxillin az SD-re jellemző $[K^+]_e$ kitérést nem vitte a vazokonstriktív tartomány alá (a kezelés után a $[K^+]_e$ kitérés amplitúdója még mindig a 20 mM feletti 29,7 \pm 5,4 mM volt) (6.3.9. ábra, C panel), mégis szinte teljes mértékben kivédte a kezdeti hipoperfúziót (6.3.8. ábra, B panel; 6.3.9. ábra, A panel), feltételezhető, hogy hipoperfúziót gátló hatását elsősorban a perivaszkuláris asztrocita-végtalpakon fejtette ki.

A nimodipin is jelentősen módosította az SD lefutását. Az L-típusú VGCC-t a vaszkuláris SMC mellett a neuronok is kifejezik. A neuronális L-típusú VGCC pedig részt vesz a neuronok ingerelhetőségének hangolásában,²⁶⁵ és jól ismert neuroprotektív célpont a neuronok Ca^{2+} telítődésének gátlására központi idegrendszeri betegségek, ezen belül iszkémiás agysérülés esetén.^{302,334} Az itt használt koncentrációban a nimodipin korábban mérsékeltén gátolta az rSD-k frekvenciáját, latenciáját és amplitúdóját patkány agykéregben.³⁰⁷ Saját eredményeink szerint a nimodipin mérsékeltén csökkenti az SD-re jellemző $[K^+]_e$ kitérés amplitúdóját (6.3.9. ábra, C panel), és jelentősen lassítja annak sebességét (6.3.9. ábra, D panel). Megfigyeléseinket alátámasztja, hogy a nimodipin 50 %-ban gátolta az akciós potenciálra jellemző, Ca^{2+} -függő és feszültségfüggő K^+ áramot, amit whole-cell patch-clamp technikával mértek ki patkány hippocampális sejtkultúrában.⁴¹ Azt is kimutatták, hogy az L-típusú VGCC kapuzza a kérgi piramisisejtek BK csatornáit.⁶⁹ Ezek alapján elképzelhető, hogy a nimodipin az SD-hez társuló, korai hipoperfúziót nem csak direkt, az SMC L-típusú VGCC-n hatva, hanem indirekt, a neuronális, kifelé irányuló K^+ áramok lassítása révén is mérsékelhette.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Kísérleteinkkel átfogó bizonyítékot gyűjtöttünk arra, hogy az SD-hez csatolt CBF változás kezdeti, hipoperfúziós szakasza $[K^+]_e$ -függő, és az érösszehúzóds szabályozásában meghatározó mértékben vesznek részt a BK csatornák. Bár a $[K^+]_e$ érösszehúzódsban játszott szerepét régóta valószínűsítik,¹⁶ azt nem hozták összefüggésbe meghatározott ioncsatornák működésével.¹⁰¹ Eredményeink bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy SD során az érátmérő-szabályozásában BK csatornák is részt vesznek, továbbá a mechanizmusban az L-típusú VGCC szerepe is tetten érhető.

Munkánk technikai szempontból is úttörőnek számít, hiszen az APG-2 és a két-foton mikroszkópia alkalmazásával olyan *in vivo* képalkotó módszert vezetünk be altatott egéren, amely a $[K^+]_e$ és az értónus közötti kapcsolat térbeli és időbeli, részletes, és pontos feltérképezéséhez.

Végül rávilágítottunk arra, hogy a fiziológiástól eltérő, magas idegszöveti $[K^+]_e$ megnyújtja a bekövetkező SD események időbeli lefutását, potenciózza a vazokonstriktációt, így SAH, TBI vagy iszkémiás stroke esetén előre vetíti az ismétlődő SD események neurodegeneratív hatását.^{96,98,164}

Az ebben az irányban folytatott további kutatásainkban a BK csatornákon túl más K^+ csatornáknak, mint pl. a befelé egyenirányító, illetve ATP-szenzitív K^+ csatornáknak a részeseését vizsgáljuk az SD-hez csatolt CBF változás modulálásában.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Menyhárt Á, Farkas AE, Varga DP, Frank R, Tóth R, Bálint AR, Makra P, Dreier JP, Bari F, Krizbai IA, **Farkas E**. Large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels are potently involved in the inverse neurovascular response to spreading depolarization. *Neurobiol Dis.* 2018;119:41-52.

6.4. Összefoglalás

Az SD terjedése az idegszövetben markáns ionáramokat, neurotranszmitter-felszabadulást és metabolikus változásokat okoz, melyek mind vazoaktív hatással bírnak. A következményes CBF változások számos jelátviteli úton jutnak érvényre, így komoly kihívást jelent egy adott szignalizációs mechanizmus részeseését meghatározni. A konkluzív vizsgálatokat nehezíti továbbá, hogy az érintett agyterület metabolikus állapotának függvényében a CBF változás nagy változatosságot mutat a fajok között (még pl. egér és patkány esetében is).¹⁶

Mivel ismerjük az SD-hez társuló CBF változások egymást követő, jól elkülönülő elemeit (2.3. fejezet), a szabályozás meghatározó mediátorait is érdemes a CBF változás fázisai szerint vizsgálni. A 6. fejezetben bemutatott kísérleteink bizonyították, hogy a CBF válaszreakció hiperémiás fázisának létrehozásában szerep jut az EP_4 receptorok aktiválásának, illetve a szöveti acidózisnak, míg a kezdeti hipoperfúzió mértékét a magas $[K^+]_e$ növeli. Végül a végső, elhúzódó oligémia fázisában is antagonizáló lehet az EP_4 receptorok aktivációja. Ezek az eredmények a keringését tekintve ép agykéregre vonatkoznak, iszkémiás körülmények között az értágító prosztaglandin útvonalat egyéb, a kísérleteinkben egyértelműen nem azonosított tényezők háttérbe szorítják, vagy felülírják.

Részben igazoltuk kiindulási hipotézisünket, amely szerint az SD-hez társuló-hiperémia reaktív jellegű, és azt döntő mértékben metabovaszkuláris csatolás szabályozza. A hiperémiát megelőzi egy $[K^+]_e$ -től függő vazokonstrikció (a vazokonstrikció vagy hipoperfúzió a reaktív hiperémia létrejöttének előfeltétele), és ép kéregben az azt követő hiperémiát potenciózza a tranziens szöveti acidózis. Elképzelésünket azonban árnyalja, hogy a neurovaszkuláris csatolás egy meghatározó szignalizációs útját, az értágító prosztaglandin útvonalat is azonosítottuk a hiperémia háttérében. Összefoglalva, kísérletes eredményeink alátámasztják a 6.0.1. ábrán felvázolt elképzelést, mely szerint a neurovaszkuláris csatolás és a metabovaszkuláris csatolás aránya az SD-t kísérő CBF változás létrehozásában a szöveti perfúzió elégtelenségével a metabovaszkuláris csatolás irányába tolódhat el.

7. Az életkor hatása az agykérgi terjedő depolarizáció kialakulására, lefutására

Minden olyan központi idegrendszeri kórképnek, amelyben az SD-nek szerepet tulajdonítanak, az életkor független rizikófaktora. Ilyen az iszkémiás stroke és a SAH, melyek előfordulási gyakorisága az életkor előrehaladtával exponenciálisan nő.^{51,194} A TBI életkorfüggésében 3 csúcs rajzolódik ki: az első a korai gyermekkorban, majd a serdülő és fiatal felnőttkorban valamint időskorban.^{33,162} Az aneurizma ruptúrát követő SAH gyakori komplikációja a DCI, melynek indikátora lehet az SD-k ismétlődő megjelenése, és azok hosszú kumulatív időtartama.^{108,361} Egy logisztikus regressziós modell alapján a fiatal életkor az aneurizmás SAH-ra jellemző DCI rizikófaktora.⁸⁵ Ugyanakkor az iszkémiás stroke kedvezőtlen kimenetele idős korban valószínű, ami mögött többek között az áll, hogy a potenciálisan ugyan megmenthető penumbra régió gyorsabban válik az irreverzibilisen károsult infarktuszórájává.^{12,299} Ebben a folyamatban is lényeges szerepet tulajdonítanak az SD-nek.¹⁶⁴

Mivel az SD-k növekvő előfordulási gyakorisága és hosszabb kumulatív időtartama az iszkémiás károsodás mértékét kísérletes körülmények között bizonyítottan növeli,^{89,270} fontos kérdés, hogy melyik az az életkor, amikor az SD-k a legnagyobb valószínűséggel és frekvenciával alakulnak ki a sérült agykéregben. Lényeges azt is megérteni, hogy a már létrejött SD milyen életkorra jellemző sajátosságokat mutat, amelyek magyarázhatják az SD által okozott neurodegeneráció súlyosságát.

A neonatális agy még nem elég fejlett ahhoz, hogy SD keletkezzen a szürkeállományban. Patkányban az SD kísérletesen a 12-15. posztnatális napon váltható ki először,^{34,309} és a kiválthatósági küszöb felnőtt korig csökken.³⁵¹ Megfogalmazódott továbbá az a vélemény, hogy az SD kiválthatósága az intersticiális tér beszűkülése révén idős korban tovább fokozódik.³⁵¹ Ezt a nézetet azonban későbbi kutatások cáfolni látszottak, hiszen leírták, hogy az idősödő idegszövetben egyre magasabb koncentrációjú KCl szükséges az SD kísérletes kiváltásához,²⁴⁸ és az életkor előrehaladtával az SD terjedése is lassul.¹⁵⁰ Megválaszolatlan kérdés tehát, hogy a fiatal felnőttől az idősig tartó életkori tartományban milyen valószínűséggel alakulhatnak ki SD események.

Mivel az SD-vel összefüggő, iszkémiás károsodásokért az elégtelen CBF válaszreakciót teszik felelőssé,⁹⁶ kérdésként merül fel az is, hogy a CBF változásnak vannak-e életkori sajátosságai. A szomatoszenzoros ingerléssel járó funkcionális hiperémia mértéke idős rágcsálókban csökken.^{386,387} Az öregedő agyban a neurovaszkuláris csatolás hatékonyságának gyengülését az agyi mikroérhálózat ritkulása,¹²⁰ az erek falában a kötőszövetes állomány feldúsulása, az érfal merevebb szerkezete,¹²⁷ az érreaktivitás oxidatív stresszel kapcsolatos sérülése,²⁸⁷ és az érújdonképződés képességének csökkenése¹²⁰ magyarázhatja.

A következőkben fiatal felnőtt, középkorú, és idős patkányokon végzett kísérleteink eredményeit foglaljuk össze. Elsődleges független változóként az életkort tekintettük az SD kiválthatóságára, annak elektrofiziológiai jellemzőire, és a kapcsolódó CBF változásra nézve. A sorrend az életkor előrehaladását követi. Az SD keletkezését és jellemzőit befolyásoló életkori sajátosságok megállapítása hozzájárulhat ahhoz, hogy azonosítsuk az SD-vel kapcsolatos agysérülésekre leghajlamosabb életkorcsoportot.

7.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció kiválthatósági küszöbének életkorfüggése

Célkitűzés

Kísérleteinkben azt tűztük ki célul, hogy az SD elektromos kiválthatósági küszöbének meghatározásával azonosítsuk azt az életkort serdülő, fiatal felnőtt, és középkorú patkányban, amikor az SD kialakulásának valószínűsége a legnagyobb. Mivel az SD kiválthatóságát az agykéreg szövettani szerveződésével hozták kapcsolatba,³⁵¹ összefüggést kerestünk továbbá az SD kiválthatósági küszöbe és az agykéreg mikrostrukturális szerveződése között, melyet a dendrittűskék sűrűségével jellemeztünk. Végül szem előtt tartva, hogy az agyi keringés szabályozása életkori sajátosságokkal bír,³⁸⁸ a CBF változás jellemzőit kívántuk az életkor függvényében meghatározni.

Módszerek

Izofluránnal altatott, különböző életkorú (7.3.1. táblázat), fiatal felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokon (n=38) a 4.3. és 5.4 fejezetben leírtak szerint 2VO-val váltottunk ki globális előagyi iszkiémiát. Egy *arteria femoralis* kanülön keresztül a MABP-t folyamatosan monitoroztuk, és artériás vérgáz mintákat gyűjtöttünk. A DC módban szűrt és nyers LFP, illetve a lokális CBF méréséhez, valamint SD-k kiváltásához a 6.3. fejezetben bemutatott módon két, nyitott koponyaablakot alakítottunk ki a parietális kéreg felett (6.3.6. ábra, A panel). A biológiai jelek felvételét a 4.3. fejezetben részletezett műszerezettséggel végeztük. Az iszkiémia indukciója előtt és után 20 perces időközönként 3-3 SD-t váltottunk ki.

7.1.1. táblázat. A kísérleti csoportok összetétele életkor szerint.

Életkor (hét)	Testtömeg (g)	n	Az adatértékeléshez összevont korcsoportok	n
7	276±14	5	7-10 hetes („serdülő”)	21
8	332±11	4		
9	348±11	5		
10	377±10	7	12-16 hetes („fiatal felnőtt”)	12
12	403±19	6		
16	465±12	6		
30	608±37	5	30 hetes („középkorú”)	5

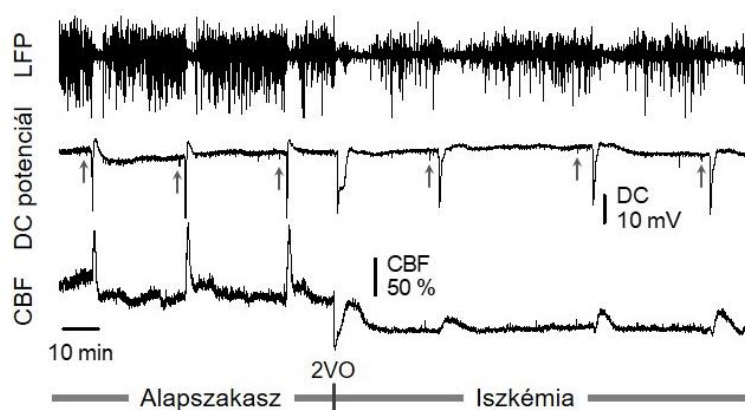
A testtömeget átlag±stdev formában fejeztük ki.

Az SD-k kiváltásához, és az elektromos kiválthatósági küszöb meghatározásához egy koncentrikus, bipoláris tűelektródát (méret: 40 µm, Neuronalektrod Kft., Magyarország) érintettünk a *dura* felszínéhez a *rostralis* koponyaablakban. Az elektródát összekötöttük egy egyenáram-kimenetű opto-elektronikus izolátorral (NL 800, Digitimer Ltd, Egyesült Királyság), egy pulzusgenerátorral (NL301), egy szélesség-késleltető panellel (NL405), és egy impulzus pufferrel (NL510), melyekkel az ingerlés amplitúdóját és hosszát szabályoztuk. Az ingerlést egyedülálló négyszögjellel végeztük. A leadott töltést a $Q[\mu\text{C}] = I[\text{mA}] \times t[\text{ms}]$ egyenlettel számítottuk, és az SD kiváltásáig 2 percenként 100 µC-os lépcsőkben emeltük. Az optimális érintkezés érdekében a tűelektróda hegyét a *dura* felszínén szükség esetén újrapozícionáltuk. Az SD sikeres kiváltását a DC potenciál 5 mV-ot meghaladó negatív kitérésére, illetve a nyers LFP depressziója igazolta (7.1.1. ábra).

A dendrittűske-sűrűség becsléséhez további 8 hetes (n=5) és 30 hetes (n=5) patkányokat klorál-hidrát túlادagolásával (i.p.) altattunk, az állatokat jégen hűtött, fiziológias sóoldattal

transzkardiálisan perfundáltak, dekapitáltak, és az agyakat eltávolítottuk. Az előagyakat a koronális síkban két, egyforma méretű darabra vágtuk, és Golgi-COX oldatba helyeztük (5 % kálium-dikromát, 5 % kálium-kromát, Molar Chemicals Kft, Magyarország; 5 % higany-klorid, VWR International, LLC).¹⁴¹ A szövetblokkokat az oldatban 10 napig inkubáltuk, az oldatot a mintákon 2-3 naponta frissítettük, végül a blokkokat további 10 napig 30 % szukróz oldatban tároltuk 4 °C-on. A mintákból vibratómmal 200 µm vastag koronális metszeteket készítettünk, a szeleteket zselatinnal bevont mikroszkópos tárgylemezre vettük fel, és egy éjszakára nedves kamrába helyeztük. A festést 30 % ammónium-hidroxiddal, és Carestream Kodak Fixálóval (Sigma) hívtuk elő. A kész metszeteket dehidráltuk és EUkitt-tel (O.Kindler, Németország) fedtük le. A megfestett agyszeleteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse E600). Az agykéreg 3-as rétegében minden állat esetén 15-16 piramisestet választottunk ki a vizsgálatra. A proximális apikális denritek másod- és harmadrendű ágainak 50 µm hosszú szakaszán becsültük meg a dendrittűke-sűrűséget (7.1.4. ábra, A panel). A kiválasztott dendritszakaszokról a mikroszkóphoz illesztett digitális kamerával (SPOT RT Slider, 1600 × 1200 dpi, 8 bit), és a megfelelő számítógépes szoftverrel (Image Pro Plus 4.5; Media Cybernetics, Bethesda, U.S.A.) kétdimenziós z-stack rekonstrukciókat készítettünk. A megadott 50 µm hosszú dendrit-szakaszokon a kísérleti csoportokat nem ismerve négy független kutató számolta meg a dendrittűkéket Image J szoftverrel (v1.44, National Institute of Health, Bethesda, U.S.A.). Az egy állatban 15-16 piramisestre vonatkozó számolás eredményeit átlagoltuk, így a statisztikai analízishez állatonként egy értékkel dolgoztunk tovább.

A kapott eredményeket $\text{átlag} \pm \text{stdev}$ formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). Egyszempontos ANOVA-t választottunk a CBF változás és a dendrittűke-sűrűség esetén, kétszempontos ANOVA-t az SD elektromos kiválthatósági küszöb elemzéséhez, és ismételt ANOVA-t a CBF alapvonal változásának analíziséhez. A kísérleti csoportok összehasonlítását Fisher-féle post hoc teszttel végeztük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$).



7.1.1. ábra. Reprezentatív helyi mezőpotenciál (local field potential, LFP), DC potenciál és lokális agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) regisztrátumok egy 8 hetes állatból. Az LFP oszcilláció amplitúdójának beszűkülése, a DC potenciál tranziens, negatív kitérése és csatolt hiperémia együttesen jelzik a terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD) megjelenését. Globális előagyi iszkémiát kétoldali *arteria carotis communis* elzárással („two-vessel occlusion”, 2VO) hoztunk létre. A nyilak a DC potenciál regisztrátum alatt az SD kiváltásához használt elektromos ingerlés helyét jelzik. A 2VO-t egy spontán is SD követte.

Élettani változók, és a terjedő depolarizációk általános jellemzése

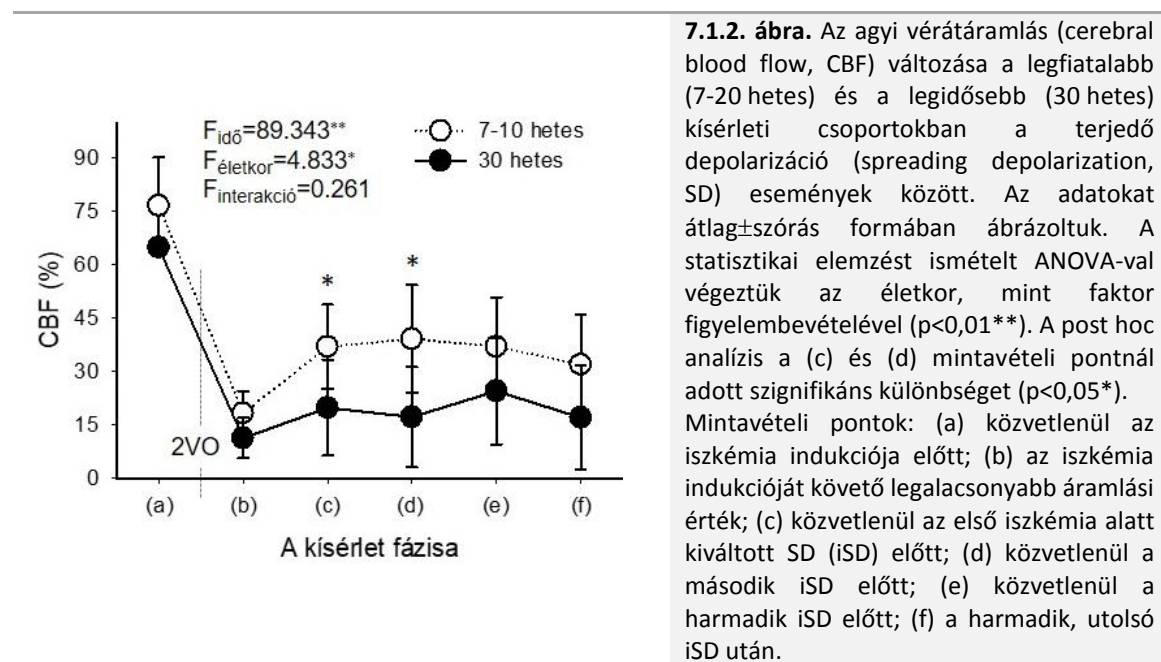
Az adatok előzetes értékelése nem mutatott életkor-függő eltéréseket az SD elektromos kiválthatósági küszöbére nézve a 7-10 hetes, és a 12-16 hetes állatok között (**7.1.3. ábra**), így az eredeti korcsoportok összevonásával a későbbiekben három kísérleti csoporttal dolgoztunk (**7.1.1. táblázat**). A MABP az alapszakaszban a három csoportban hasonló értékeket mutatott (98 ± 4 , 95 ± 3 és 107 ± 10 Hgmm, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes). Az iszkémia indukciója mérsékelten, életkortól függetlenül emelte a MABP-ot (105 ± 5 , 96 ± 4 és 114 ± 2 Hgmm, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes). Az artériás vérgáz értékek az élettani tartományban mozogtak; sem az életkor, sem az iszkémia nem fejtett ki hatást a $p\text{CO}_2$ -re vagy a pH-ra.

Az artériás vércukorszint mérése azért volt lényeges, mert ismert, hogy a magas vércukorszint (i.e. 23-24 mmol/l) mellett az SD-t nehézkes kiváltani,¹⁷⁹ így a kiválthatósági küszöb életkorfüggésére vonatkozó következtetéseinknél fontos figyelembe venni. A vércukorszint az alapszakasz és az iszkémia során hasonló értékeket vett fel (e.g. $9,23\pm 1,7$ vs. $9,20\pm 1,2$ mmol/l, iszkémia vs. alapszakasz a 7-10 hetes csoportban), ugyanakkor az életkor előrehaladtával szignifikánsan emelkedett (e.g. $11,95\pm 1,6$ vs. $10,08\pm 1,0$ vs. $9,2\pm 1,2$ mmol/l, 30 hetes vs. 12-16 hetes vs. 7-10 hetes az alapszakaszban).

Az elektromos ingerlésre az agykéregben SD-k jelentkeztek. A kísérletek több, mint felében (25 esetben a 38-ból) az iszkémia indukciója után közvetlenül egy spontán SD esemény is kialakult (**7.1.1. ábra**), a spontán SD-eket azonban jellemzőik nagy változatossága miatt számszerűsítve nem értékeltük. Az SD-hez csatolt CBF változást az alapszakasz és az iszkémia alatt is minden korcsoportban a hiperémiás fázis dominálta. A 4.1.2. és a 4.2.1. fejezetben bemutatott eredményeknek megfelelően az első SD-hez csatolt CBF változás a visszatérő SD-ktől abban különbözött, hogy a hiperémiás fázist gyakran rövid hipoperfúzió előzte meg, és minden esetben elhúzódó oligémia követte (**4.1.5. ábra**).

Az iszkémia lefolyása, az áramláscsökkenésre adott kompenzáció dinamikája

Az érhálózat kompenzációs képességét az iszkémiát indukáló áramlasesésre úgy mértük fel, hogy a kísérleti protokoll során az SD-k között számos mintavételi pontból meghatároztuk a CBF-et (**7.1.2. ábra**). A legfiatalabb, 7-10 hetes korcsoportban a CBF az iszkémia indukciója után közvetlenül 18 ± 6 %-ra esett, az első iszkémia alatt kiváltott SD (iSD) előtt 37 ± 12 %-ra tért vissza, és 30 % körül maradt az iszkémia hátralevő részében. A 30 hetes korcsoportban a CBF esés minimuma alacsonyabbnak, 11 ± 6 %-nak bizonyult, az első iSD előtt csak 20 ± 13 %-ra rendeződött, és az iszkémiás periódusban már nem emelkedett 20 % fölé (**7.1.2. ábra**). Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az idősebb, 30 hetes korcsoportban az iszkémia ellen ható kompenzációs mechanizmusok kevésbé hatékonyak, mint a fiatalabb, 7-10 hetes csoportban. Bár az öregedés folyamatának része az agyi érhálózat megritkulása¹²⁰ vagy az érfalak megvastagodása,¹²⁷ az itt vizsgált fiatal felnőtt életkorban az idős korra jellemző, az optimális agyi keringést hátráltató patológiai elváltozások még nem alakulhattak ki. Úgy gondoljuk tehát, hogy a kompenzáció 30 hetes korcsoportban tapasztalt romlása a vazoreaktivitás életkorral összefüggő gyengülésének köszönhető. Ennek oka lehet az adenzoin szignalizáció hatékoynságának romlása, az NO korlátozott elérhetősége, vagy az ATP-szenzitív K^+ -csatornák nyitási karakterisztikájának megváltozása.²¹⁸



A terjedő depolarizáció kiválthatóságának elektromos küszöbe

A későbbi, 7.2. és 7.3. fejezetben bemutatásra kerülő munkáink során azt tapasztaltuk, hogy az öregedő patkányokban az SD kiváltásához magasabb K^+ koncentráció szükséges, a visszatérő SD események frekvenciája csökken, és az SD spontán kialakulásának valószínűsége is kisebb. Agyszelet preparátumot vizsgálva is rávilágítottak arra, hogy az életkor előrehaladtával az SD kiválthatósági küszöbe emelkedik.²⁴⁸ Ugyanakkor juvenilis életkorban az agy érésével az SD kiválthatósági küszöbe csökken.³⁵¹ Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogy az SD kialakulásának valószínűsége melyik életkorban a legnagyobb, illetve a kiválthatósági küszöb korai felnőttkorban mikor kezd emelkedni.

Definíció szerint az SD elektromos kiválthatósági küszöbe az a legalacsonyabb töltésmennyiség, ami az SD provokációjához elegendő. Az elektromos ingerlés a küszöbérték meghatározására azért előnyös, mert a KCl-os kiváltással szemben finoman hangolható, pontosan számszerűsíthető, és a korcsoportok közötti, várhatóan kicsi eltérések így jó eséllyel kimutathatók.

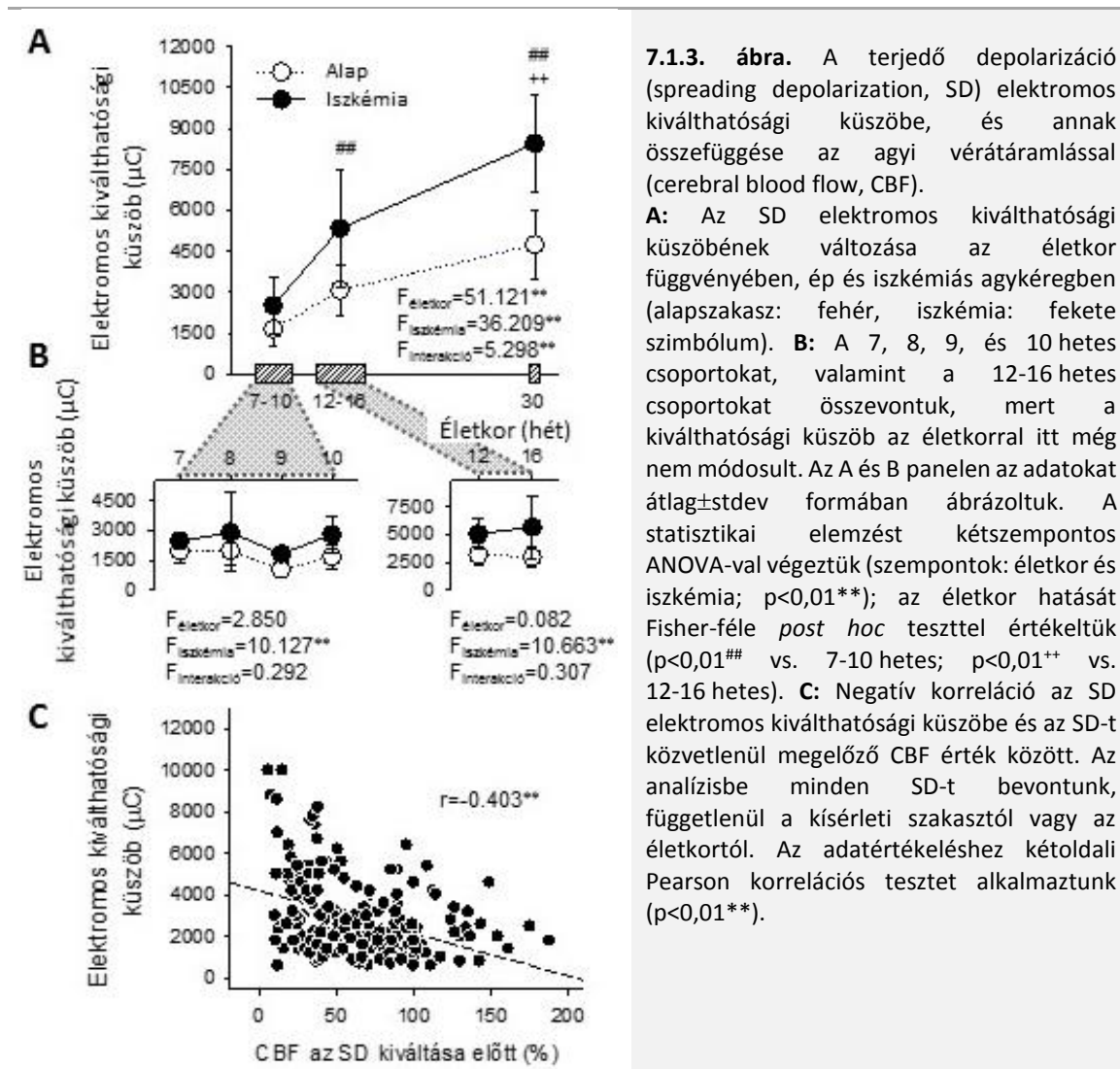
Az SD elektromos kiválthatósági küszöbe iszkémia alatt az alapszakaszhoz képest minden vizsgált korcsoportban emelkedett (**7.1.3. ábra, A panel**). Az SD kiváltásához az életkor előrehaladtával is egyre nagyobb töltésmennyiségre volt szükség, mind az alapszakasz (4743 ± 1282 vs. 3076 ± 915 vs. $1661 \pm 649 \mu C$, 30 hetes vs. 12-16 hetes vs. 7-10 hetes), mind az iszkémia alatt (8447 ± 1763 vs. 5343 ± 2170 vs. $2514 \pm 1032 \mu C$, 30 hetes vs. 12-16 hetes vs. 7-10 hetes) (**7.1.3. ábra, A panel**). Az életkor emelkedésével továbbá egyre nagyobb különbség adódott a kiválthatósági küszöbértékben az iszkémia és az alapszakaszban kiváltott SD-k között. Másként szólva, ötször akkora töltéskülönbséget számoltunk ki az alapszakasz és az iszkémia között a 30 hetes állatokban, mint a 7-10 hetes korcsoportban (4278 ± 2352 vs. $853 \pm 839 \mu C$, 30 hetes vs. 7-10 hetes). Végül a kiválthatósági küszöb és a CBF kapcsolatának értékelése azt mutatta, hogy minél alacsonyabb értéken mozgott a CBF közvetlenül az SD kiváltása előtt, annál nagyobb töltésmennyiség leadásával lehetett az SD-t kiváltani ($r = -0,403^{**}$) (**7.1.3. ábra, C panel**).

Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy az SD-t iszkémia alatt azért nehezebb kiváltani, mert az SD kiválthatósága a szövet metabolikus állapotának függvénye. Ezt bizonyítja például, hogy a hiperglikémia (i.e. 23-24 mmol/l) az SD kiválthatóságát gátolja.¹⁷⁹ A magas glükózkoncentráció hatását kísérleteinkben azonban kizárhatjuk, egyrészt azért, mert a mért vércukorszintek a normoglikémiás tartományban maradtak (e.g. 9-11 mmol/l) – messze az SD-t

gátló, hiperglikémiás koncentráció alatt, másrészt azért, mert az alapszakasz és az iszkémia fázisa során vett artériás vérminták között glükózkoncentrációban nem mutattunk ki különbséget.

Fontolóra vettük a szöveti pH hatását is, mert élő agyszelet preparátumban azt találták, hogy ha a médiumot CO₂-vel dúsítják, vagy megvonják belőle a bikarbonátot, a létrehozott acidózis (pH 6,67-6,97) gátolja az SD kiváltását és terjedését.³⁸⁴ A csökkenő szöveti pH valószínűleg úgy akadályozza az SD terjedését, hogy gátolja az NMDA receptorok aktivitását.³⁷⁷ Ismert, hogy az iszkémia során acidózis lép fel az idegszövetben; globális előagyi iszkémia modellünkben például a kérgi pH 7,3-ról akár pH 6,8-ra is csökkenhet (5.4. fejezet). Ezek alapján logikus azt feltételezni, hogy az SD iszkémia alatt tapasztalt magasabb kiválthatósági küszöbe a szöveti acidózisnak tudható be. A 6.2. fejezetben részletezett vizsgálataink szerint azonban a szöveti pH csökkenése csak az ép keringésű kéregben gátolja az SD-t, iszkémia során az összefüggés nem érhető tetten.

A fentiek alapján azt tartjuk a legvalószínűbbnek, hogy az iszkémiás állapotokra jellemző magas K⁺ konduktancia, az idegsejteket hiperpolarizálja, illetve a repolarizációt támogatja. Ennek eredményeképp a neuronok ingerelhetősége csökken,³³⁸ ami az SD kiválthatóságát is behatárolja.



7.1.3. ábra. A terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) elektromos kiválthatósági küszöbe, és annak összefüggése az agyi vérátáramlással (cerebral blood flow, CBF).

A: Az SD elektromos kiválthatósági küszöbének változása az életkor függvényében, ép és iszkémiás agykéregben (alapszakasz: fehér, iszkémia: fekete szimbólum). **B:** A 7, 8, 9, és 10 hetes csoportokat, valamint a 12-16 hetes csoportokat összevontuk, mert a kiválthatósági küszöb az életkorral itt még nem módosult. Az A és B panelen az adatokat átlag±stdev formában ábrázoltuk. A statisztikai elemzést kétszemponos ANOVA-val végeztük (szempontok: életkor és iszkémia; p<0,01**); az életkor hatását Fisher-féle *post hoc* teszttel értékeltük (p<0,01^{##} vs. 7-10 hetes; p<0,01⁺⁺ vs. 12-16 hetes). **C:** Negatív korreláció az SD elektromos kiválthatósági küszöbe és az SD-t közvetlenül megelőző CBF érték között. Az analízisbe minden SD-t bevontunk, függetlenül a kísérleti szakasztól vagy az életkortól. Az adatértékeléshez kétoldali Pearson korrelációs tesztet alkalmaztunk (p<0,01**).

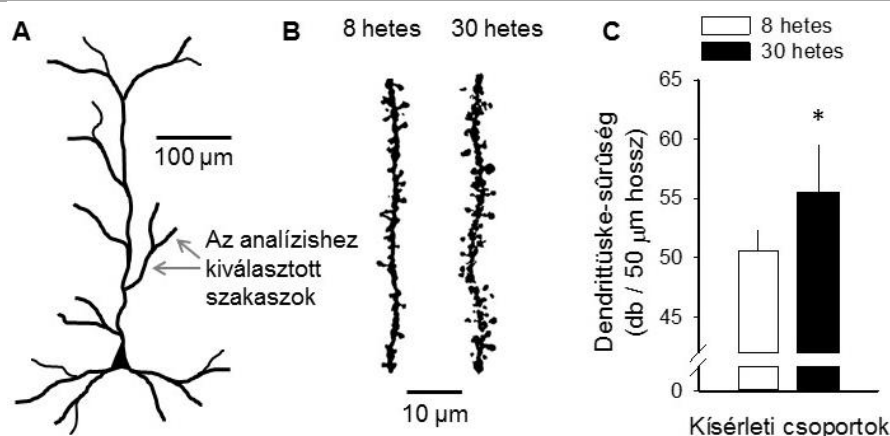
A dendrittüske-sűrűség, és a terjedő depolarizáció kiválthatósága az életkor függvényében

Vizsgálataink abból a feltételezésből indultak ki, hogy a kéreg mikrostruktúrájának korfüggő, dinamikus változása, melyet a dendrittüskék sűrűségével jellemeztünk, hatással lehet az SD

kiválthatóságára. A kísérleteket naív állatokon végeztük; a dendrittűskék iszkémiával vagy SD-vel összefüggő átrendeződését nem tanulmányoztuk.

A dendrittűske-sűrűséget az agykéreg 3-as rétegében, a piramis sejtek proximális apikális denritjének másod- és harmadrendű ágain határoztuk meg (7.1.4. ábra, A panel). A dendrittűskék jellemzően kisebb csoportokba rendeződve fordultak elő; a 30 hetes állatokban nagyobbak és alakjukat tekintve összetettebbek voltak, mint a 8 hetes csoportban (7.1.4. ábra, B panel). A dendrittűskék sűrűsége a 30 hetes állatokban szignifikánsan meghaladta a 8 hetes életkorban becslést (55 ± 4 vs. 51 ± 2 tűske/50 μm dendritszegmens, 30 hetes vs. 8 hetes) (7.1.4. ábra, C panel).

A dendrittűskéken a serkentő szinapszisok poszt-szinaptikus elemei találhatóak. A dendrittűskék tanulmányozását indokolta, hogy kialakulásuk vagy visszahúzódásuk az agy érésével és öregedésével dinamikusan változik,^{88,161} az SD terjedésében meghatározó szerepet töltenek be,¹⁷⁴ valamint ismert, hogy az SD-k spontán ismétlődése a dendrittűskék akut sérüléséhez vezet.³¹¹ A két vizsgált korcsoport közötti különbség bizonyította, hogy a patkány agykéreg szövettani szerveződése a 8-30 hetes életkortartományban mérhető változáson megy keresztül. Az eredmények alapján elképzelhető, hogy a felnőttkor első szakaszában az SD kiválthatósága az életkor előrehaladtával az agykéreg szövettani és biokémiai érésével, és az idegsejtek közötti kapcsolatok megszilárdulásával összefügg.



7.1.4. ábra. A dendrittűske-sűrűség a piramis sejtek proximális apikális denritjének másod- és harmadrendű ágain, az agykéreg 3-as rétegében. **A:** A vizsgált dendritszakaszokat egy kérgi piramis sejt sematikus rajzán jelöltük meg. **B:** Egy 8 hetes és egy 30 hetes állatból származó, reprezentatív, 50 μm hosszú dendritszakasz képrekonstrukciója. A felvételeket az eredeti z-stack képekből a kontraszt és a fényerő optimalizálása (azaz a nem specifikus háttérzaj minimalizálása) után nyertük. **C:** Dendrittűske-sűrűség a két vizsgált korcsoportban. Az adatokat átlag \pm stdev formában ábrázoltuk. A statisztikai értékelést egyszempontos ANOVA-val végeztük ($n=5/\text{csoport}$; $F=6,263$; $p<0,05^*$).

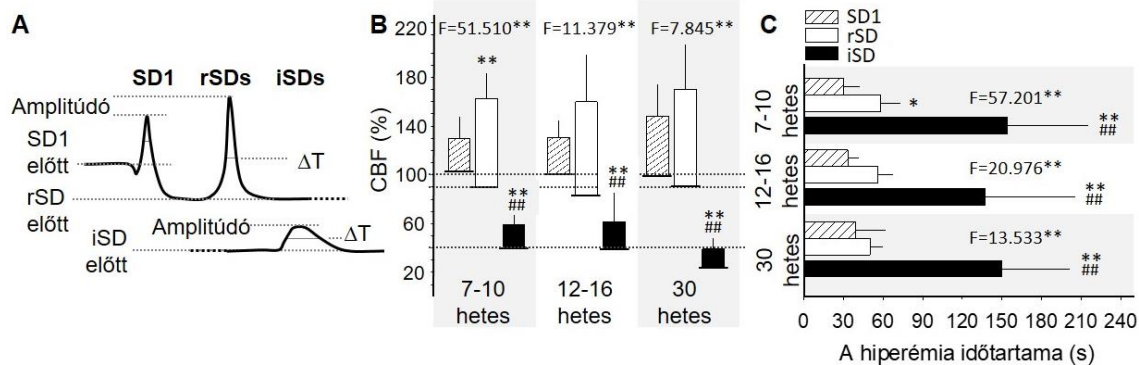
A terjedő depolarizációhoz csatolt vérátáramlási változás

Az SD-hez kapcsolódó CBF változás értékeléséhez külön analizáltuk az SD1-et, az alapszakasz alatt kiváltott rSD-ket, és sz iszkémia során kiváltott iSD-ket (7.1.5. ábra, A panel). Korábbi megfigyeléseinkkel összehangban (4.1.2. és 4.2.1. fejezet) az rSD-k alacsonyabb CBF értékről indultak, mint az SD1 (pl. 90 ± 30 vs. 102 ± 12 %, rSD vs. SD1 a 7-10 hetes csoportban). Az iSD-hez társuló CBF változás ennél jóval alacsonyabb alapáramlásról indult (39 ± 15 és 38 ± 11 %, 7-10 hetes és 12-16 hetes); az alap különösen alacsony volt a 30 hetes csoportban (23 ± 14 %). Az rSD-hez csatolt hiperémia csúcsa 160-170 % körül mozgott (163 ± 45 , 160 ± 61 és 170 ± 69 %, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes), kb. 20-30 %-al magasabban, mint az SD1-el járó hiperémia maximális amplitúdója (129 ± 23 , 131 ± 17 és 149 ± 24 %, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes). Az iSD-t követő CBF válaszreakció a maximális kitérésnél jelentősen alacsonyabb értéket vett fel (59 ± 23 és

61±18 %, 7-10 hetes és 12-16 hetes), különös tekintettel a 30 hetes csoportra (39±22 %). Bár a 30 hetes állatok elmaradása a fiatalabb csoportoktól szemmel látható volt (pl. iSD-k esetén a hiperémia csúcsa a 30 hetes állatokban a fiatalabb csoportok iSD-t megelőző alapáramlását sem érte el) (7.1.5. ábra, B panel), a különbség mégsem bizonyult statisztikai szempontból szignifikánsnak. Az SD-k időtartama az SD1-nél bizonyult a legrövidebbnek (30±12, 33±7 és 39±23 s, 7-10 hetes, 12-16 hetes 30 hetes), növekedett az rSD-k esetén (58±14, 56±11 és 50±10 s, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes), és minimum kétszeresére emelkedett az iSD-k során (154±61, 137±68 és 150±52 s, 7-10 hetes, 12-16 hetes és 30 hetes) (5.1.5. ábra, C panel). A hiperémia hosszát az életkor nem befolyásolta.

A hiperémia jellemzőit iszkémia során, kontrollált körülmények között (értsd: nem spontán jelentkező, hanem kiváltott SD-k) az 5.4. és a 6.1 fejezetben már érintettük. A fiatal felnőtt korcsoportokra vonatkozó eredményeink, melyek szerint iszkémia során az SD-hez csatolt hiperémia amplitúdója csökken, időtartama elnyúlik, előző megfigyeléseinket és más munkacsoportok eredményeit¹³³ egyaránt igazolják. A hiperémia késleltett lecsengésére a következő magyarázat szolgál. Az elnyúló hiperémia hosszabb LFP depresszióval és az SD-t jelző hosszab DC kitéréssel esik egybe (7.3. fejezet).⁹⁶ A nyugalmi membránpotenciál helyreállításában az SD után meghatározó szerepet játszik a K⁺/Na⁺ pumpa. Addig, míg a nyugalmi membránpotenciál nem rendeződik, a pumpa folyamatosan fennálló ATP igénye hozzájárul a hiperémia fenntartásához. Ezek alapján a hiperémia hosszát az SD időtartama szabja meg.⁹⁶

A vizsgált korcsoportokban (7-30 hét) nem azonosítottuk az életkor hatását az SD-hez kapcsolódó CBF változásokra. Igaz ugyan, hogy az idegszövet az életkor előrehaladtával kevésbé hajlamos az SD-re, az azt követő CBF változás fiatal felnőtt korban megtartott marad.



7.1.5. ábra. A terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) csatolt agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz értékelése. **A:** Az első SD (SD1), az alapszakasz alatt kiváltott SD-k (rSD), és az iszkémia során provokált SD-k (iSD) amplitúdóját, fél amplitúdónál mért időtartamát (ΔT), és az SD-t megelőző alapáramlást értékeltük. **B:** A hiperémia csúcsértéke (oszlopok csúcsa), és az SD-t megelőző áramlásérték (oszlopok alapja). **C:** A hiperémia fél amplitúdónál mért időtartama. Az adatokat átlag±stdev formában ábráztuk. A statisztikai elemzéshez minden egyes életkorcsoportra egyszempontos ANOVA-t használtunk ($p < 0,01^{**}$). Az SD-k típusai közötti különbség értékelésére Fisher-féle post hoc tesztet alkalmaztunk ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$ vs. SD1; $p < 0,01^{##}$ vs. rSD).

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

A patkányban itt tanulmányozott 7-30 hetes életkor az emberben a serdülő, fiatal felnőtt-, és középkornak feleltethető meg.³³⁶ Eredményeink egyediek, hiszen azok a kutatások, amelyek az agyi iszkémiás sérülések patomechanizmusát, annak életkori sajátosságait tanulmányozzák, elsősorban az élet nagyon korai szakaszára (pl. neonatális aszfixia), vagy az idős korra (pl. iszkémiás stroke) koncentrálnak. A bemutatott eredményeink felhívják a figyelmet olyan idegéletani változásokra, melyek a felnőttkor kezdetén játszódnak le az agyban, és megfelelnek azoknak a

véleményeknek, melyek szerint az agy érése, az idegsejthálózatok strukturális és biokémiai szerveződése még fiatal felnőtt korban is zajlik.³⁴⁸

Eredményeink olyan szempontból is jelentősek, hogy a TBI, melyben az SD-k kórélettani szerepe mára vitathatatlan,^{165,176,250,385} serdülő és fiatal felnőtt korban fordul elő nagy gyakorisággal.^{33,162} Azonban a fiatal betegek kilátásai a sikeres felépülésre jobbak, mint az időseké.¹⁸⁹ Eredményeink ezekkel az adatokkal ellentmondásosak lennének, ha minden SD egyforma szövetkárosító hatással bírna. Azonban ismert, hogy az SD akkor hordozza magában a legnagyobb veszélyt, ha terjedő iszkémiával jár,⁹⁶ illetve abban az esetben, ha autoregulációs zavarral társul.¹⁷⁶ Az is megalapozott vélemény, hogy a másodlagos sérülések mértéke a visszatérő SD-k növekvő kumulatív időtartamával függ össze.^{89,108} Azonban ez az időtartam független lehet az SD-k számától, hiszen a visszatérés az egyes SD-kból, különösen az idős agyban, jelentősen késhet. Eredményeink szerint fiatal korban az SD kiváltásának alacsony küszöbe kedvez az ismétlődő SD-k kialakulásának. További kutatások és klinikai vizsgálatok tárgyát képezi, hogy ez a léziók növekedésének szempontjából mennyire tekintendő súlyozott faktornak.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Hertelendy P, Menyhárt Á, Makra P, Süle Z, Kiss T, Tóth G, Ivánkovits-Kiss O, Bari F, Farkas E. Advancing age and ischemia elevate the electric threshold to elicit spreading depolarization in the cerebral cortex of young adult rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2017;37(5):1763-1775.

7.2. Az agykérgi terjedő depolarizáció az idősödő, krónikusan hipoperfundált agyban

Háttér és célkitűzés

Az iszkémiás agysérülések pathomechanizmusait tanulmányozó kísérletes kutatások zömében fiatal felnőtt rágcsálókra hagyatkoznak, ami az eredmények transzláthatóságát jelentősen megnehezíti,^{90,91} hiszen az iszkémiás agysérülések elsősorban az időseket érintik. Az iszkémiás stroke előfordulási gyakorisága például 50 éves kor felett minden egyes évtizedben megduplázódik, kimenetele pedig az agy öregedésével súlyosbodik.^{12,51,235} Lényeges tehát idősödő rágcsálókban is megállapítani, hogy az SD, mint az iszkémiás infarktus kiterjedésének növekedésében szerepet játszó tényező, milyen életkori jellegzetességekkel bír.

Az életkori tényezők hatását középkorú (10 hónapos) patkányokban vizsgáltunk tovább. Az öregedéssel járó idegrendszeri tüneteiket krónikus agyi hipoperfúzióval is súlyosbítottuk. Az SD kiválthatóságát ezekben a kísérletekben az azonos kiváltó stimulusra adott SD gyakorisággal, vagy az egymást követő SD-k között eltelt idővel jellemeztük. Az SD-k elektrofiziológiai jellemzőin túl a CBF változások elemzésére is kiemelt figyelmet fordítottunk.

Módszerek

A kísérleti csoportokat a **7.2.1. táblázat** foglalja össze. Röviden, az SD mintázatának vizsgálatakor középkorú, 10 hónapos Wistar patkányokon még 2 hónapos korban, klorál-hidrát (400 mg/kg, i.p.) altatásban krónikus agyi hipoperfúziót indukáltunk permanens 2VO-val (5.3. fejezet) (n=8). Kontrollként áloperációt hajtottunk végre (n=8). Az életkor szerinti kontroll csoportot az SD-k vizsgálatok fiatal, 2 hónapos, az operáció szempontjából naív állatok alkották (n=6).

7.2.1. táblázat. A kísérleti beavatkozások és csoportok áttekintése.

Csoport	Krónikus agyi hipoperfúzió létrehozása			SD-k regisztrálása	
	Beavatkozás	Életkor (hónap)	Testtömeg (g)	Életkor (hónap)	Testtömeg (g)
Fiatal (n=6)	N/A	N/A	N/A	2	315±17
Középkorú (n=8)	Áloperált	2	286±9	10	657±17**
Középkorú+ Iszkémia (n=8)	2VO	2	280±5	10	585±19**,#

A testtömeget átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízist egyszempontos ANOVA-val, és Fisher-féle post hoc teszttel végeztük ($p < 0,01^{**}$ vs. Fiatallal, és $p < 0,01^{##}$ vs. Középkorú). Rövidítések: 2VO: kétoldali *arteria carotis communis* elzárás (two-vessel occlusion); SD: terjedő depolarizáció (spreading depolarization); N/A: nem alkalmazható, vagy nincs adat.

Az SD-k mintázatát felmérő kísérleti napon halotán altatásban (4.1.2. fejezet) a baloldali *arteria* és *vena femoralis*-ba polietilén kanült helyeztünk a MABP folyamatos monitorozására, és a kísérletet befejező, a szívét megállító levegő embólus beinjektálására. A jobb parietális koponyaacsonton két koponyaablakot alakítottunk ki az SD-k kiváltására (*caudalis*) és az események elektrofiziológiai és lézer-Doppleres elvezetésére (*rostralis*) (4.3.1. fejezet). Az SD-keket folyamatosan úgy provokáltuk, hogy a *caudalis* koponyaablakban egy méretre vágott, 1 M KCl oldattal átitatott szűrőpapírt helyeztünk a *dura* mentes agyfelszínre. A kétórás regisztráció során a szűrőpapírt 15 percenként frissítettük.

A rostralis koponyaablakból egy intrakortikális üvegkapilláris elektróda segítségével LFP-t és DC potenciál jelet vezetünk el a nyak bőre alá beültetett Ag/AgCl referencia-elektrodához képest, a 4.1.1. fejezetben megadott paraméterek szerint. A lokális CBF változásokat a 4.1.2. fejezetben megadott módszerek alkalmazásával, lézer-Doppleres áramlásméréssel rögzítettük.

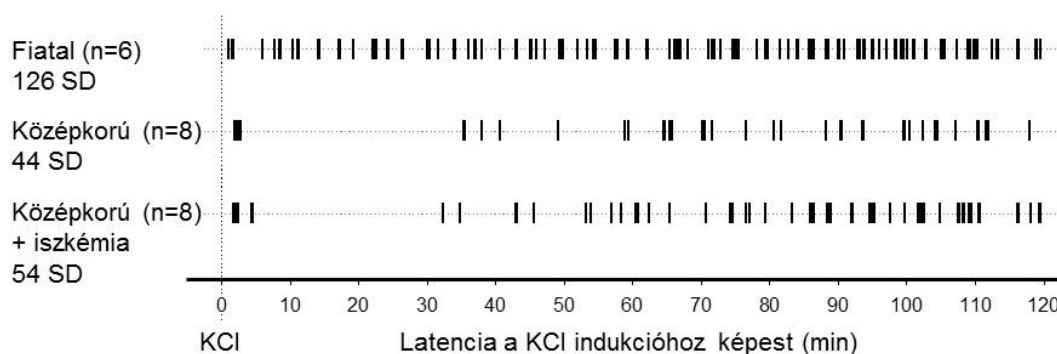
Az SD eseményeket legmegbízhatóbban az LFP tranziens depressziója és a szinkron jelentkező CBF változás együttesen jelezte. A DC potenciál negatív kitérése nem rajzolódott ki teljességében minden egyes eseményre olyan esetben, amikor az SD-k nagy frekvenciával követték egymást. Ezek alapján az SD előfordulásának gyakoriságát (SD események száma az egymást követő 15 perces időablakokban), és latenciáját (az első SD megjelenése a KCl topikális alkalmazásához képest, ill. az első és második SD között eltelt idő) az LFP segítségével számoltuk ki. Az első SD esetén meghatároztuk az LFP depresszió időtartamát is.

A kapott eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). Az SD-k frekvenciájának értékeléséhez ismételt ANOVA-t, az összes további változó elemzéséhez egyszempontos ANOVA-t és Fisher-féle post hoc tesztet alkalmaztunk ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$). Az adatsorok közötti lehetséges összefüggéseket kétoldali Pearson-féle korrelációs teszttel vizsgáltuk ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$).

A terjedő depolarizációk gyakorisága

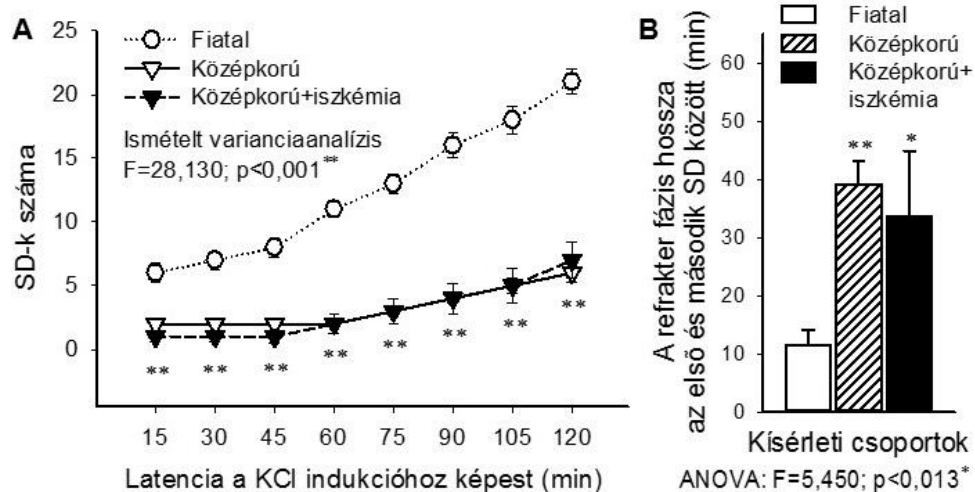
A két óra hosszan folyamatosan jelen lévő stimulus (KCl) mellett az SD-k ismétlődő mintázatban jelentek meg. Az SD-k mindkét középkorú csoportban kisebb gyakorisággal alakultak ki, mint a fiatalok esetén (7.2.1. ábra). Tizenötperces időablakokra lebontva, az SD-k száma az idő előrehaladtával egyre nőtt: az első 15 percben a fiatal csoportban 6 ± 1 , az utolsó 15 percben 21 ± 1 SD-t regisztráltunk. A középkorú és a középkorú+iszkémiás csoportban az első 15 percben csak 2 ± 1 és 1 ± 0 , az utolsó időablakban pedig a fiatalnál jóval kisebb számú, 6 ± 1 és 7 ± 1 SD-t azonosítottunk a regisztrátumokon (7.2.2. ábra, A panel). A két középkorú csoportot

összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a krónikus iszkémiás állapot az ismételten jelentkező SD-k gyakoriságára nem volt további hatással.



7.2.1. ábra. Az életkor hatása a kísérletesen kiváltott, ismétlődő, terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) gyakoriságára. A diagram az SD események időbeli eloszlását szemlélteti a három kísérleti csoportra nézve. A függőleges vonalak csoportonként minden állat minden egyes SD eseményének megjelenését jelölik az idő függvényében.

Az SD-k eloszlása a kétórás kísérleti periódus első felében a fiatal csoportban közel egyenletesnek mutatkozott, ugyanakkor a középkorú állatok esetén ugyanezen a szakaszon egy 20-30 perces, eseménymentes időszak rajzolódott ki (**7.2.1. ábra**). Az SD-k ritka előfordulásának hátterében két okot azonosítottunk: (i) Az első SD jelentős késéssel alakult ki a stimuláció megkezdéséhez képest a középkorú+iszkémiás csoport egyes állataiban (latencia: $20,0 \pm 11,1$ vs. $2,6 \pm 0,04$ vs. $2,2 \pm 0,7$ min, középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal), bár a nagy szórás miatt a különbséget statisztikai szempontból nem tekinthettük meghatározónak. Ez a változó a szövet ingerelhetőségét jellemzi. (ii) Az első és második SD között eltelt idő azonban mindkét középkorú csoportban számottevően megnövekedett (33 ± 11 vs. 39 ± 4 vs. 11 ± 3 min, középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal) (**7.2.2. ábra, B panel**). A két SD között eltelt idő indikátora egyrészt annak, hogy a szövet milyen mértékben hajlamos az SD kialakulására, másrészt azt mutatja meg, hogy az első esemény után milyen hatékonyan áll helyre a kéreg ingerelhetősége. Megfigyelésünk egybecseng az SD idős korra jellemző, lassab terjedési sebességével, melyet 24 hónapos patkányokban határoztak meg,¹⁵⁰ és azt az agykéreg ingerelhetőségének gyengülésével hozták összefüggésbe.^{352,373,412} Eredményeink ellentmondani látszanak azzal a megfigyeléssel, mely szerint idős patkányból származó agyszeleteken az anoxiával provokált SD kisebb latenciával alakult ki, mint a fiatal állatokból nyert szeleteken,³¹³ de egyeznek azokkal az eredményekkel, melyek szerint 10 hónapos (a saját kísérleteinkkel egyező életkor) patkány agyszeleten az SD kiváltásához szignifikánsan magasabb K^+ koncentráció szükséges, mint 8 hetes kontrollok esetén.²⁴⁸ Az itt bemutatott adataink teljes összhangban állnak a **7.1. fejezet** tanulságaival, mely szerint az SD elektromos kiválthatósági küszöbe felnőtt korban emelkedni kezd. Mindezek alapján elmondható, hogy az SD kialakulásának valószínűsége ugyanazon körülmények mellett az életkor előrehaladtával csökken.



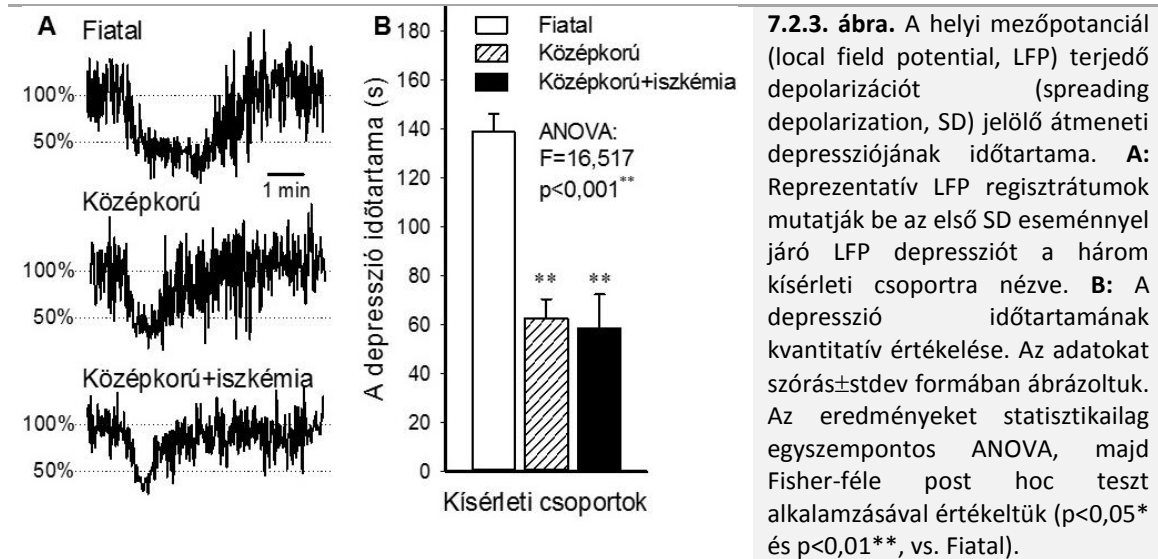
7.2.2. ábra. A terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) keletkezésének valószínűsége az életkor függvényében. **A:** Az SD-k összesített száma 15 perces időablakokra bontva, folyamatos KCl ingerlés mellett. **B:** A második SD esemény késése (i.e. a refrakter fázis hossza) az első SD eseményhez képest. Az adatokat szórás±stdev formában ábráztuk. Az eredményeket statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p<0,05^*$ és $p<0,01^{**}$, vs. Fiatál).

A terjedő depolarizációra jellemző LFP depresszió életkori sajátosságai

Az LFP oszcillációjának beszűkülése, azaz az agykérgi elektromos aktivitás átmeneti lecsendesedése az idegsejtek depolarizációjával, és a Na^+ csatornák ezt követő inaktivációjával függ össze, melynek következtében akciós potenciál nem váltható ki. Az LFP depresszió, mely tehát az SD során a szinaptikus aktivitás átmeneti szünetelését jelzi, az első SD-vel a fiatal állatokban átlagban 2 percnél hosszabb ideig állt fenn (139 ± 7 s), míg a középkorú csoportokban ez az időtartam a felére csökkent (63 ± 8 és 59 ± 14 s, középkorú és középkorú+iszkémia) (7.2.3. ábra). A krónikus hipoperfúzió az LFP depresszió időtartamát továbbá érdemben nem befolyásolta (7.2.3. ábra). Az eredmények azt sugallják, hogy a középkorú csoportokban az SD után a szinaptikus aktivitás hamarabb tért vissza, mint a fiatalban. Ez egyrészt jelezheti azt, hogy az SD hullámfrontján egy adott időpillanatban kevesebb sejt depolarizálódik, így a hullámfront térben „keskenyebb” lesz, ami meggyorsítja az idegsejtek aktivitásának visszatérését. Másrészt, ahogy alább tárgyalni fogjuk, az SD-hez csatolt CBF válaszreakció életkortól függő jellegzetességeivel is magyarázható.

Az agyi vérátáramlási változások életkortól függő jellegzetességei

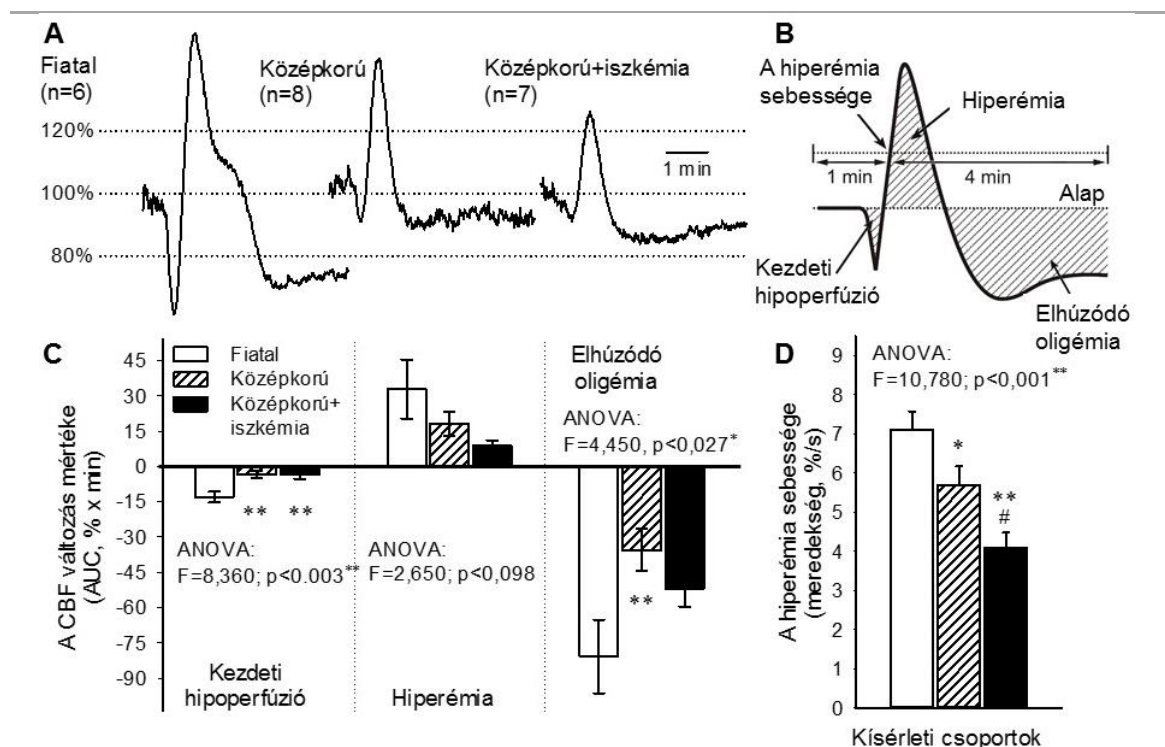
Az első SD-vel járó CBF változást annak három szakaszára nézve (kezdeti, rövid hipoperfúziót, domináns hiperémia, és a hosszan elhúzódó oligémia; 2.2. fejezet) értékeltük. A három fázis mindegyik kísérleti csoportban jól azonosítható, de eltérő mértékű volt (7.2.4. ábra). A kezdeti hipoperfúzió a fiatal állatokban szembetűnőnek, míg a középkorú csoportokban ehhez képest jelentősen kisebb mértékűnek bizonyult (görbe alatti terület: $3,6\pm 1,7$ vs. $3,5\pm 1,6$ vs. $13,0\pm 2,2\%$ ×min; középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal) (7.2.4. ábra, C panel). Mivel korábbi kutatások eredményei szerint a kezdeti hipoperfúzió mértékét a hipotenzió súlyosbítja,³⁶² megvizsgáltuk, hogy korcsoportjaink között vérnyomás tekintetében van-e különbség.



Azonos altatási paraméterek mellett a középkorú állatok vérnyomása átlagban 10 Hgmm-rel magasabb érték körül mozgott, mint a fiatal állatoké (MABP: 87 ± 2 vs. 86 ± 2 vs. 77 ± 3 Hgmm; középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal). Az eredmények alapján indokoltnak tekintettük, hogy összefüggést keressünk a kezdeti hipoperfúzió mértéke és a MABP között. A vizsgálat igazolta, hogy alacsonyabb MABP mellett a kezdeti hipoperfúzió elmélyül (**7.2.5. ábra, A panel**). Feltételezzük tehát, hogy a középkorú csoportokban a kezdeti hipoperfúzió mértéke a magasabb vérnyomás függvényében csökkent. Elképzelésünk szerint a fiatal állatokban az alacsonyabb MABP mellett a (cerebro)vaszkuláris simaizom ellazultabb állapotban van, hogy az alacsonyabb perfúziós nyomást kompenzálja. Az ellazult simaizom az erek falában pedig határozottabban vazokonstriktációt eredményez.

A korai hipoperfúzió mértéke az LFP depresszióval is szoros kapcsolatot mutatott. Az első SD-re nézve, az elmélyülő kezdeti hipoperfúzió és az LFP depresszió hossza között erős, pozitív korrelációt állapítottunk meg (**7.2.5. ábra, B panel**). Eredményeink egybe csengenek korábban leírt összefüggésekkel, mely szerint a markánsabb kezdeti hipoperfúzió korrelál az SD-t jelző negatív DC potenciál kitérés hosszával.^{15,362} Feltételezzük, hogy a kezdeti hipoperfúzió az idegszövetben a metabolitok utánpótlásának átmeneti elégtelenségét okozza, ami késlelteti az idegi elektromos aktivitás visszatérését.

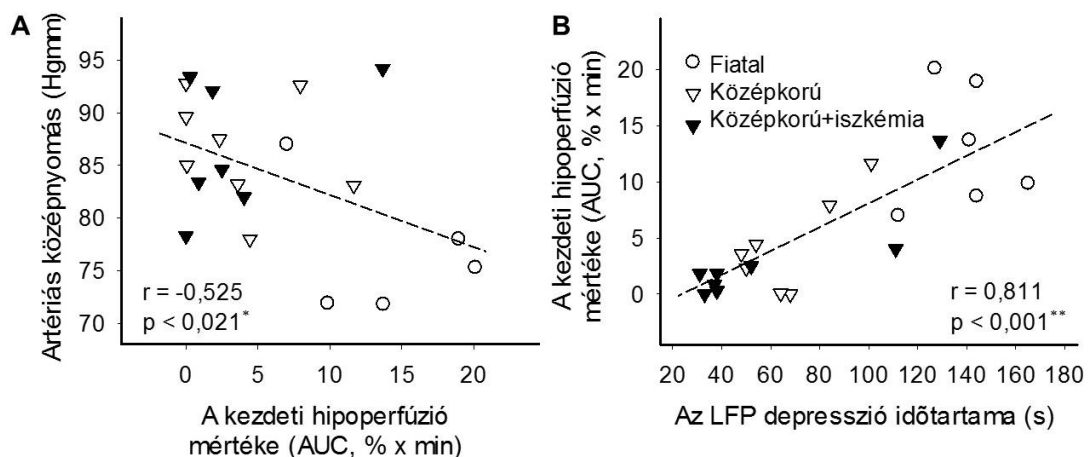
A hiperémia mértéke az életkor előrehaladtával csökkent, amelyet a krónikus hipoperfúzió tendenciózan tovább fokozott (görbe alatti terület: $8,9 \pm 2,1$ vs. $18,1 \pm 4,9$ vs. $32,8 \pm 12,6$ %×min; középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal; egyszempontos ANOVA: $p < 0,098$) (**7.2.4. ábra, C panel**). A hiperémia lassabb ráta mellett érte el csúcspontját a középkorú csoportban, mint a fiatalban, és a krónikus hipoperfúzió a hiperémia felfutását tovább lassította ($4,1 \pm 0,4$ vs. $5,7 \pm 0,5$ vs. $7,1 \pm 0,5$ %/s; középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal) (**7.2.4. ábra, D panel**). A krónikus iszkémia hiperémiát hátráltató hatását igazolja, hogy az MCAO után 24 órával kísérletesen kiváltott SD-kkel a hiperémia amplitúdója és görbe alatti területe kisebb volt azokban az állatokban, amelyekben az infarktus a kérget is érintette.⁴²⁷ A hiperémia mértékének a középkorú csoportban tapasztalt elmaradása a fiattól hasonló azokhoz az eredményekhez, melyek az agyi érválaszok, köztük elsősorban a neurovaszkuláris csatolás hatékonyságának romlását az életkor előrehaladtával hozzák kapcsolatba.^{379,386,394} Az öregedéssel gyengülő agyi érválaszok hátterében egyrészt a neurovaszkuláris csatolásban központi szerepet betöltő asztrociták funkciómódosulása, másrészt az endotélium szabadgyökök által okozott sérülése állhat.³⁷⁹



7.2.4. ábra. Az agyi vérátáramlás (cerebral blood flow, CBF) lokális változása az első terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD). **A:** Az első SD-hez csatolt CBF változást az egyes csoportokban kapott regisztrátumok átlagaként fejeztük ki (az elemszámokat a vonaldiagramok mellett tüntettük fel). **B:** A CBF változás három, egymást követő fázisának mértékét a görbe alatti területtel (area under the curve, AUC) jellemeztük egy 5 perces szakaszon, melynek első percét a hiperémiás komponens félamplitúdójához képest határoztuk meg. **C:** A CBF változás három fázisának (i.e. kezdeti hipoperfúzió, hiperémia és elhúzódó oligémia) mértéke. **D:** A hiperémia kialakulásának félamplitúdónál mért, maximális sebessége. Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{stdev}$ formában ábrázoltuk. Az eredményeket statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$, vs. Fialtal; $p < 0,05^\#$, vs. Középkorú).

Végül a CBF változás harmadik fázisa, az elhúzódó oligémia is kisebb mértékűnek adódott a középkorú csoportokban (görbe alatti terület: $50,8 \pm 7,7$ vs. $35,6 \pm 8,9$ vs. $80,8 \pm 15,6$ %/s; középkorú+iszkémia vs. középkorú vs. fiatal) (7.2.4. ábra, C panel). Jelenlegi ismereteink szerint az SD a cerebrovaszkuláris simaizomsejtekben serkenti a vazokonstriktív hatással bíró 20-HETE szintézisét, mely hozzájárul SD-vel járó CBF változás oligémiás komponensének kialakulásához.¹³⁴ Az idősödő agyi érhálózatban azonban a 20-HETE szignalizáció megváltozik; a fiatal, hipertenzív rágcslókból izolált MCA például képes a miogén tónus 20-HETE alapú adaptációjára, az idős agyból származó MCA azonban nem.³⁸⁸

Összefoglalva, a fiatalhoz képest a középkorú csoportokban az SD-hez csatolt CBF változás mind a három fázisa kisebbnek bizonyult, és a középkorú állatokban a hiperémiát a krónikus agyi hipoperfúzió tovább csökkentette. Az agyi érreakciók hatékonysága – legyenek azok konstriktív vagy dilatátor természetűek – az életkor előrehaladtával mérséklődött. Mivel a 7.1. fejezetben bemutatott életkortartományban a CBF változások még nem mutattak értékelhető különbségeket, megállapítható, hogy patkányban 10 hónapos korban figyelhetők meg először az agyi érreaktivitás gyengülésének jelei.



7.2.5. ábra. Korreláció az első terjedő depolarizációhoz (spreading depolarization, SD) csatolt kezdeti hipoperfúzió mértéke és az artériás középnyomás (a felvételek első 15 percén vett átlag) (A), valamint a helyi mezőpotenciál (local field potential, LFP) depressziójának időtartama között (B). Az összefüggéseket kétoldali Pearson-féle korrelációs teszttel értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$).

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Elsőként hívtuk fel a figyelmet arra, hogy az agy öregedése során folyamatosan fennálló stimulus esetén az agykéregben egyre ritkábban ismétlődésének az SD-k. A változás oka vagy az idegszövet ingerelhetőségének gyengülése, vagy az egyes SD-k utáni regeneráció idejének megnyúlása. A munkánkat megelőző nézet szerint az SD kiválthatósága az életkor előrehaladtával fokozódik, mert az intersticiális tér beszűkül.³⁵¹ Ez a vélemény azonban olyan kísérletek alapján fogalmazódott meg, amelyeket juvenilis rágcsálókön végeztek;^{195,246} idős állatokra vonatkozó adatok viszont nem álltak rendelkezésre. Munkánk tehát hiánypótló, és új ismeretekkel bővítette az SD-re vonatkozó szakirodalmat.

Az iszkémiás agysérülések, köztük elsőként a stroke előfordulási gyakorisága 50 éves kor felett minden egyes évtizedben megduplázódik, kimenetele pedig az agy öregedésével súlyosbodik.^{12,51,235} Az iszkémiás agysérülések pathomechnizmusait tanulmányozó kísérletes kutatásokat korábban zömében fiatal felnőtt rágcsálókön végezték, ami nehezíti az eredmények transzlálhatóságát.^{90,91} Az agy öregedésére koncentrált kutatásaink – különös tekintettel az iszkémia és az SD jelenségére – tehát fontos kérdéskört vizsgálnak, és lényeges, új eredményekkel járulhatnak hozzá agysérülések hátterében álló pathomechanizmusok megértéséhez.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemény:

Farkas E, Obrenovitch TP, Institóris Á, Bari F. Effects of early aging and cerebral hypoperfusion on spreading depression in rats. *Neurobiol Aging*. 2011;32(9):1707-15.

7.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció az idős, akut iszkémiának kitett agyban

Háttér és célkitűzés

Az életkor hatásával foglalkozó tanulmányainkat folytatva -az iszkémia és az öregedés további összefüggéseit mutatjuk be. Ezeket a kísérleteket az emberi öregkornak megfeleltethető, kétéves patkányokon végeztük, és eredményeinket fiatalokkal (1,5-2 hónapos) vagy középkorúakkal (9 hónapos) vetettük össze. Az alkalmazott globális és fokális előagyi iszkémia modellekben közös, hogy mindkét esetben az iszkémiás penumbrára jellemző állapotot idéztünk elő, hiszen a CBF a kísérletes érelzárást követően, a monitorozott kérgi területen, a penumbrában általánosan uralkodó 20-40 % körül mozgott.^{10,19} Az SD terjedésének tanulmányozása az iszkémiás penumbrán transzlációs szempontból jól megalapozott, hiszen az SD iszkémiás sérülések során a penumbra régiót veszélyezteti leginkább.¹⁶⁴

7.3.1. Globális előagyi iszkémia

Módszerek

Kísérleteink során az 5.3. és 5.4. fejezetben leírtak szerint Sprague Dawley vagy Wistar patkányok két korcsoportjában (2 hónapos és 2 éves, n=26), izoflurán vagy halotán altatásban, 2VO-val 40 percig tartó globális előagyi iszkémiát idéztünk elő (fiatal: n=8, idős: n=6). Kontrollként álműtött vagy naív állatok szolgáltak (fiatal: n=6, idős: n=6). A jobb parietális koponyacsonton két kraniotómiát hoztunk létre az SD-k kiváltására (*caudalis*) és a jelenségek elektrofiziológiai és lézer-Doppleres megfigyelésére (*rostralis*) (4.3.1. fejezet). Az SD-ket 10 perccel a 2VO létrehozása után, a 7.2. fejezetben részletezett módszerrel, folyamatosan provokáltuk. Az idős állatokban az 1 M KCl az SD sikeres kiváltásához gyakran túl alacsony koncentrációnak bizonyult, ezért vagy 3 M KCl oldatot használtunk, vagy ha így sem sikerült SD-t kiváltani, egy apró KCl kristályt helyeztünk a feltárt, *dura* mentes agyfelszínre. A kísérleteket az állatok túlaltatásával fejeztük be.

A rostralis koponyaablakból egy intrakortikális üvegkapilláris elektróda segítségével LFP-t (ebből szűréssel választottunk le a DC potenciál jelet) vezettünk el. Referenciaként a nyak bőre alá beültetett Ag/AgCl elektróda szolgált (a paramétereket a 4.1.1. fejezetben ismertettük). A lokális CBF változásokat a 4.1.2. fejezetben megadott módszerek alkalmazásával, lézer Doppleres áramlásméréssel rögzítettük.

Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. Az SD-t jelölő DC potenciál-kitérés és a CBF változás paramétereinek statisztikai analízisét SPSS szoftvertben (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.) egyszempontos ANOVA modellel, majd Fisher-féle post hoc teszttel végeztük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$). A CBF válaszreakciók típusainak eloszlását a kísérleti csoportok között nem-parametrikus Fisher-féle egzakt próbával értékeltük ($p < 0,001^{**}$).

Perfúziós változások az iszkémiás periódus során

A 2VO-t követően a CBF meredeken esett: a fiatal iszkémiás csoportban az alapáramlásnak tekintett 100 %-ról 41±9 %-ra, az idős iszkémiás csoportban 38±18 %-os értékre csökkent. A 40 perces iszkémiás periódus végén a fiatal állatokban a kérgi perfúzió átlagban 43±22 % körül állapodott meg. Ugyanakkor az idős csoportban alacsonyabb értéken, 18±14 %-on stabilizálódott, ami szignifikánsan elmaradt a fiatal állatokban mérthez képest ($p < 0,024^*$), és az idős csoportban a 2VO után közvetlenül mért perfúziós értékhez képest is tovább csökkent ($p < 0,028^*$).

Az iszkémiát okozó hirtelen áramlasesés lassú, részleges kompenzációja kollaterálisokon keresztül valósulhat meg.²¹⁸ Az idős állatokban az áramlasesés kompenzációja nem következett be, sőt, a kérgi perfúzió tovább, 20 % alá csökkent. Ismert, hogy a 20 % alatti perfúziós

tartományban az idegszövet elektromos aktivitása nem tartható fenn.¹⁰ Ez a megfigyelés kísérleteinkben is igazolódott: idős állatokban az alacsony áramlással szinkron tartós LFP depressziót tapasztaltunk. Bár az idős állatokban az érhálózat életkorral összefüggő megritkulása indokolhatná az alacsony kompenzációs kapacitást,¹²⁰ a CBF változásokra vonatkozó eredményeink tükrében a kép összetettebbnek tűnik. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a huzamosan fennálló perfúziócsökkenésben SD-hez társuló terjedő iszkémia is szerepet játszik.

A terjedő depolarizáció mintázatának változása iszkémia és öregedés hatására

A folyamatosan fennálló KCl-os ingerlés hatására – a 7.2. fejezetben ismertetettekhez hasonlóan (7.2.1. ábra) – az SD-k rendszertelenül ismétlődő mintázatban alakultak ki. Míg a fiatal állatok esetén az 1 M KCl koncentráció mindig elegendőnek bizonyult az SD-k kiváltásához, addig az idős csoportokban jellemzően 3 M KCl oldattal vagy egy apró KCl kristállyal sikerült csak SD-t provokálni. Az SD kiválthatósági küszöbének az életkor előrehaladtával összefüggő emelkedését (Isd. 7.1. és 7.2. fejezet) így idős, kétéves állatokban is igazoltuk.

Az SD-ket jellemzően a DC potenciál tranzienst, negatív kitérése jelezte (7.3.1. ábra, A panel) egy idős, iszkémiának kitett állat kivételével, amelyben az KCl-es ingerlés rögtön az első eseménynél terminális depolarizációt idézett elő (i.e. a DC potenciál nem tért vissza az alapra, és az LFP is izoelektromos maradt a kísérlet befejeztéig). A fiatal és idős iszkémiás csoportban a KCl-es ingerlés kezdetétől az iszkémia végéig eltelt 30 perces időintervallumban 2-3 SD-t, a kontroll csoportokban ugyanezen idő alatt 4-5 eseményt figyeltünk meg. Az SD-k előfordulásának ritkulása egybecseng azzal a 7.1. fejezetben bemutatott eredménnyel, hogy az iszkémia az SD-k elektromos kiválthatósági küszöbét emeli (7.1.3. ábra).

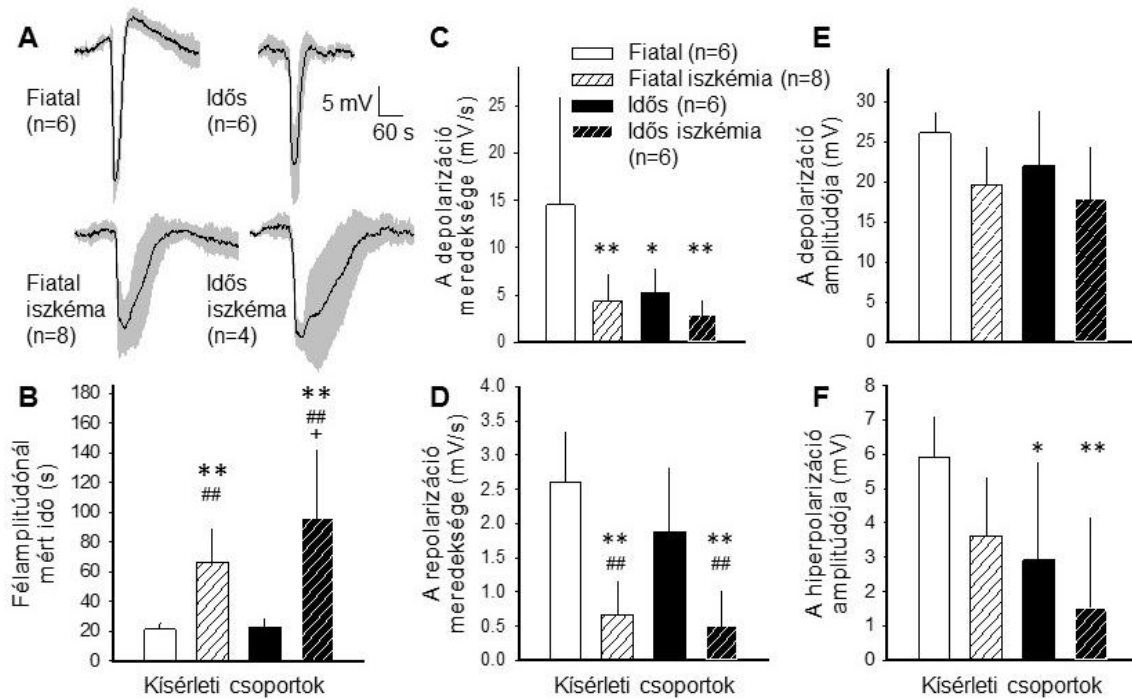
Az első SD értékelése szerint, az iszkémia alatt kiváltott SD után a nyugalmi LFP a kontrollhoz képest késve rendeződött (SD időtartama: $66,2 \pm 22,8$ vs. $21,4 \pm 4,1$ s, fiatal iszkémia vs. fiatal). Az idős kor az SD-t követő visszatérést tovább késleltette ($95,8 \pm 46,2$ s; idős iszkémia) (7.3.1. ábra, B panel). Ezzel összhangban, a depolarizáció és a repolarizáció kisebb meredekségével alakult ki (depolarizáció: $14,5 \pm 11,4$ vs. $4,4 \pm 2,9$ mV/s, fiatal iszkémia vs. fiatal; repolarizáció: $0,7 \pm 0,5$ vs. $2,6 \pm 0,7$ mV/s, fiatal iszkémia vs. fiatal) (7.1.3. ábra, C-D panel). Az idős kor önmagában is mérsékelte a depolarizációs rátát ($1,9 \pm 0,9$ vs. $2,6 \pm 0,7$ mV/s, idős vs. fiatal) (7.1.3. ábra, C panel). Az eredmények megfelelnek annak megfigyelésnek, hogy fokális iszkémiában az iszkémiás góc irányából az érintetlen szöveti zóna felé haladó SD-k egyre gyorsabb lefutásúak.^{270,344}

Az SD-k megnyúlása inkább a lassabb lefutású depolarizációnak és a lassabb repolarizációnak, mint a depolarizáció elnyúló platójának tudható be. A depolarizáció során Na^+ áramlik az idegsejtekbe, amellyel egyidejűleg nagymértékű K^+ kiáramlás történik.^{158,351} Iszkémiás agyszövetben az intra- és extracelluláris tér között fennálló ionkoncentráció-grádiens ugyan még mindig számottevő, de a fiziológiásnál alacsonyabb (i.e. $[\text{Na}^+]_e$ 140 mM-ról 80 mM-ra csökken, $[\text{K}^+]_e$ 2-4 mM-ról 10-12 mM-ra emelkedik; az intracelluláris koncentrációk ellenkező irányú változásaival egyidőben).^{111,317,351} A K^+ kiáramlás és a Na^+ beáramlás hajtóereje tehát gyengülhet, ami a depolarizáció lassulásában tükröződhet. A repolarizáció oldaláról nézve a folyamatot, a nyugalmi membránpotenciál helyreállításához nélkülözhetetlen az ATP-t felhasználó Na^+/K^+ pumpa zavartalan működése. Iszkémia esetén az oxidatív szubsztrátok utánpótlása gátolt, az ATP mennyisége csökken, a Na^+/K^+ pumpa aktivitása elégtelenné válik, a repolarizáció pedig késve valósulhat meg.^{96,151,244}

Az időskor tovább növelte az iszkémia során kiváltott SD-k hosszát, illetve egy állat esetében repolarizációt egyáltalán nem tapasztaltunk. Ismert, hogy a repolarizáció az SD-t követő CBF változás mintázatának függvénye. Ha az SD-hez terjedő iszkémia társul, a repolarizáció előfeltétele annak mérséklődése.⁹⁶ Kísérleteinkben az idős csoportban gyakran tapasztaltunk terjedő

iszkémiát (lásd alább), ami magyarázatot adhat az időskorban jellemző elhúzódó SD-kre. Tekintve, hogy a hosszabb idejű SD-k elősegítik a másodlagos sérülések progresszióját,^{89,108,270} elképzelhető, hogy az SD számottevően hozzájárul az iszkémiás sérülések életkorral kapcsolatos súlyosbodásához.^{12,235,236,299}

Végül az SD-t követő hiperpolarizáció amplitúdóját az iszkémia, és különösképpen az idős kor csökkentette ($2,9 \pm 2,9$ vs. $5,1 \pm 1,2$ mV, idős vs. fiatal) (7.3.1. ábra, F panel). A hiperpolarizáció jelensége mögött valószínűleg a Na^+ extracelluláris koncentrációjának túllövése, vagy a Cl^- túlzott, átmeneti felszaporodása állhat.¹⁵⁸

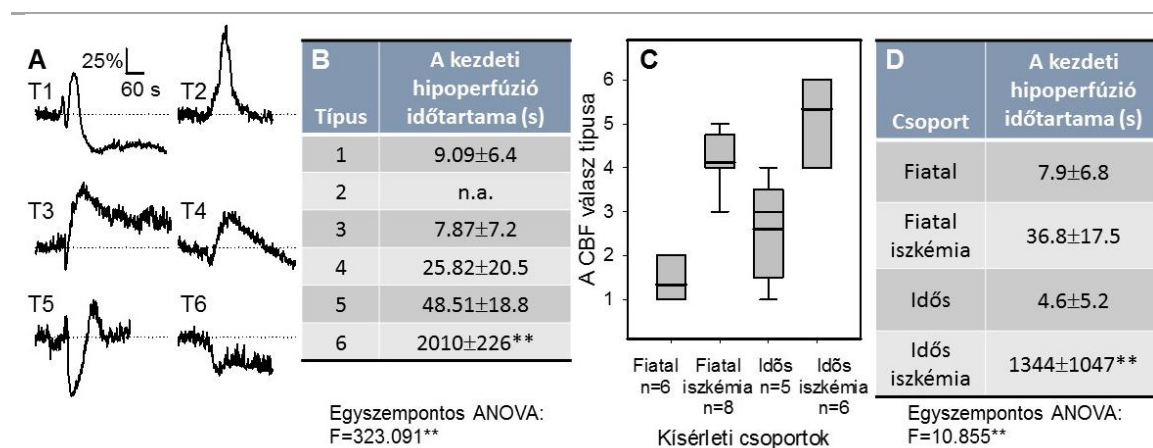


7.3.1. ábra. Az iszkémia és az öregedés hatása a sorozatban kiváltott első terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) jelző DC potenciál kitérésre. **A:** Az SD-t jelölő DC kitérés átlaga (\pm stdev) az egyes csoportokra nézve. Az elemszámokat a vonaldiagramok mellett tüntettük fel. **B:** Az SD fél amplitúdónál mért időtartama. **C:** A depolarizáció maximális sebessége (a depolarizáció meredeksége). **D:** A repolarizáció maximális sebessége (a repolarizáció meredeksége). **E:** A depolarizáció relatív amplitúdója. **F:** A repolarizáció relatív amplitúdója. Az oszlopdiagramokon az adatokat átlag \pm stdev formában ábrázoltuk. Az eredményeket statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$, vs. Fiatal; $p < 0,05^\#$ és $p < 0,01^{\#\#}$, vs. Idős; $p < 0,05^+$, vs. Fiatal iszkémia).

Az idős agyban nagy valószínűséggel alakul ki terjedő iszkémia

Elemztük az SD hatására kialakuló CBF változásokat, amelyeket lefutásuk mintázata szerint hat jellegzetes alcsoportba soroltunk (T1-T6) (7.3.2. ábra, A panel). A fizioiogiásnak tekintett válaszreakcióból (T1-T2) indultunk ki, majd a CBF változásokat a korai hipoperfúzió növekvő mértéke szerint rendeztük sorba (T3-T5). Az utolsó csoportot a terjedő iszkémia képezte (T6) (7.3.2. ábra, A panel). Néhány SD-t nem kísért értékelhető áramlási változás. Csoportosításunk alapját azok a közlemények képezték, amelyek szerint az áramlási válasz első komponense, a kezdeti hipoperfúzió az iszkémiára jellemző csökkenő perfúziós nyomással arányosan válik egyre meghatározóbbá.¹⁷⁸ Így a kezdeti hipoperfúzió mértékét tekintettük osztályozási szempontnak,^{106,178} melynek megfelelően a kezdeti hipoperfúzió hossza a T1-T6 sorrend szerint növekedett (7.3.2. ábra, B panel).

A következőkben meghatároztuk, hogy az SD1-hez csatolt CBF válaszreakció a négy kísérleti csoportban milyen típusok szerint oszlott meg. Míg a fiatal kontroll csoportban csak fiziológias áramlási válaszok jelentkeztek (T1: n=4/6; T2: n=2/6), a fiatal iszkémiás állatokban az SD1-hez T3-T5 típusú CBF mintázatok társultak; közülük a T4 bizonyult a leggyakoribbnak (n=5/8) (7.3.2. ábra, C panel). Az idős kontroll állatok esetén az áramlási változások T1-T4 között oszlottak meg, egy esemény kivételével, amikor az SD1-hez nem társult értékelhető CBF változás. A fiatalhoz képest az idős csoportban gyakrabban jelentkeztek kifejezettebb korai hipoperfúziót mutató választípusok. Az idős iszkémiás állatokban T4 és T6 típusú CBF változásokat figyeltünk meg, melyek között szembeötlően gyakori volt a terjedő iszkémia (T6) (n=4/6) (7.3.2. ábra, C panel). Az iszkémiás állapotban jelentkező CBF válaszreakciók típusai szinte teljes egyezést mutattak iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek agykérgéből regisztrált áramlási mintázatokkal.⁴¹⁵ A kezdeti hipoperfúzió az iszkémia alatt elhúzódott (36,8±17,5 vs. 7,9±6,8 s; fiatal iszkémia vs. fiatal), ami az idős iszkémiás csoportban a gyakori terjedő iszkémia hatására révén tovább fokozódott (1344±1047 s) (7.3.2. ábra, D panel).

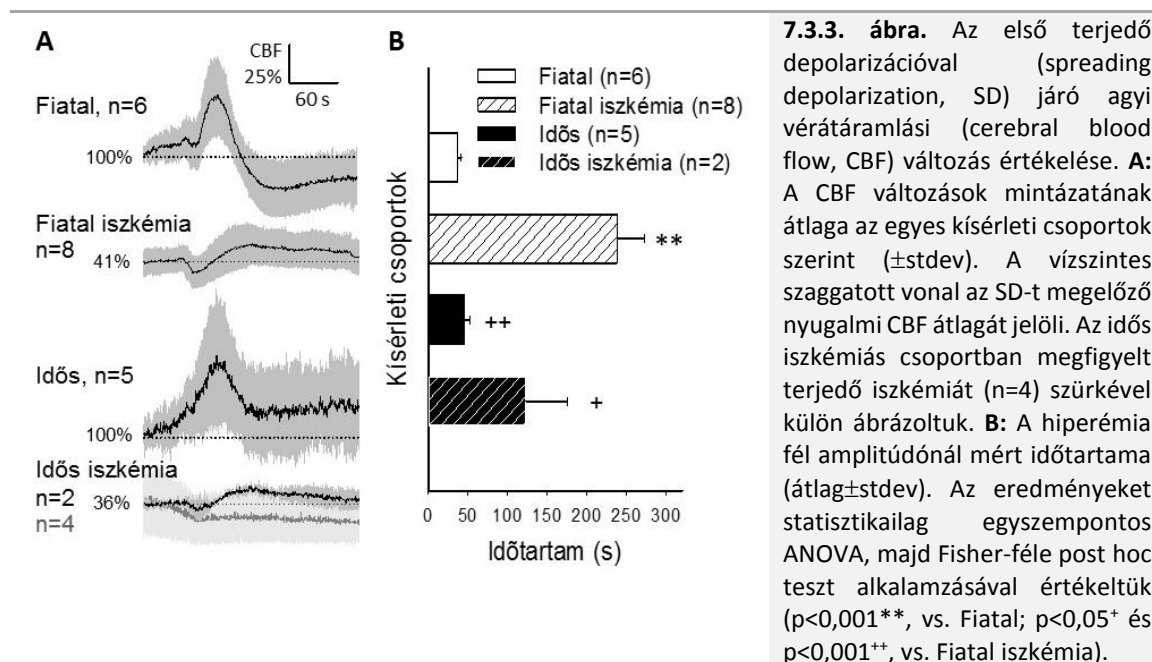


7.3.2. ábra. A terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD) járó agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) változások jellemzői. **A:** A megfigyelt áramlási változások minden egyes típusát egy-egy reprezentatív regisztrátum szemlélteti. A CBF változásokat a fiziológiasnak tekintettből (T1-T2) kiindulva a korai hipoperfúzió növekvő mértéke szerint (T3-T5) a terjedő iszkémiával bezárólag (T6) osztályoztuk. **B:** Az SD-t követő CBF változás korai hipoperfúziós komponensének fél amplitúdónál mért időtartama az egyes csoportokban. Az egyszempontos ANOVA-t követő Fisher-féle poszt hoc teszt a T6 vs. T1 közötti eltérést jelezte szignifikánsnak ($p < 0,001^{**}$). **C:** Az SD1-el járó CBF változások összegzett jellemzői. Az eredményeket statisztikai szempontból nem-parametrikus, Fisher-egzakt teszttel értékeltük ($p < 0,001^{**}$). **D:** A CBF változás első, korai hipoperfúziós komponensének fél amplitúdónál mért időtartama az egyes kísérleti csoportok szerint. Az egyszempontos ANOVA-t követő Fisher-féle poszt hoc teszt alapján az idős iszkémiás csoport tért el az összes többi csoporttól meghatározó mértékben ($p < 0,001^{**}$).

A tranziens hiperémiát is magukban foglaló áramlási válaszreakciók (i.e. T1-T5) számszerűsített értékelése szerint az iszkémia során a fiatal és az idős állatokban is jelentősen csökkent a hiperémia amplitúdója (57±10,1 vs. 156±47,7 %, fiatal iszkémia vs. fiatal; 30±17,9 vs. 181±72,7 %, idős iszkémia vs. idős) (7.3.3. ábra). Ugyanakkor a hiperémia időtartama iszkémia alatt az intakt kéregben regisztrálthoz képest jelentősen elhúzódott (237±97 vs. 37±12 s, fiatal iszkémia vs. fiatal; 122±75 vs. 46±14, idős iszkémia vs. idős). Az iszkémia hatásával kapcsolatos eredmények teljes összhangban állnak az 5.4. és 6.1. fejezetben bemutatottakkal (5.4.2. és 6.1.2. ábra).

Új eredményeinket szerint (i) az idős agyban gyakrabban jelentkezik az SD kapcsán kifejezett korai hipoperfúzió; (ii) az idős hipoperfundált agyban jelentősen emelkedik a terjedő iszkémia kockázata, és (iii) az *arteria carotis communis*ok elzárását követően az agykérgi perfúzió az idős agyban fokozatosan csökken, a hatékony kompenzációs mechanizmusok hiányát jelezve.

Ahogy a 6.3. fejezetben bemutatottuk, az SD-t követő CBF változás korai hipoperfúziós fázisát a magas $[K^+]_e$ emeli ki, míg a terjedő iszkémia hátterében a tartósan magas $[K^+]_e$ mellett az értágító NO hiánya valószínűsíthető.⁴¹³ Iszkémia során az NO a szuperoxid anionnal peroxinitritet képez, ami inkább citotoxikus mint értágító hatású.⁴¹⁰ A fiziológias öregedés során az NO szöveti koncentrációja és az NO-tól függő vazodilatáció csökken, feltehetően a fokozott szabadgyöktermelődés miatt.^{254,394} Mindezek növelik az SD során a terjedő iszkémia kialakulásának esélyét, amely fokozza a perfúzió elégtelenségét.



7.3.2. Fokális előági iszkémia

Módszerek

A beavatkozásokat felnőtt, hím Wistar patkányok három korcsoportjában (6 hetes, fiatal, n=7; 9 hónapos, középkorú, n=6; és 2 éves, idős, n=7) halotán alátatásban végeztük (4.1.2. fejezet). Az artériás középnyomást (mean arterial blood pressure, MABP) a farokartériába vezetett polietilén kanülön keresztül (PE50) folyamatosan követtük. Fokális, tranzien iszkémiát kétoldali *arteria carotis communis* okklúzióval (2VO) (5.3. fejezet) és a jobboldali *arteria cerebri media* disztális szakaszának együttes elzárásával hoztunk létre (distal middle cerebral artery occlusion, dMCAO) (5.1. fejezet). A dMCAO-t egy mikroklipp felhejlesztésével valósítottuk meg, hogy a klipp eltávolításával később reperfúziót hozhassunk létre.⁶⁶ Az ipsilaterális parietális koponyacsonton zárt koponyaablakot alakítottunk ki, majd a feltárt agykérget feszültségfüggő festékkel (RH-1838) töltöttük fel (4.1.2. fejezet). A koponyaablakban multi-modális képalkotással követtük a mezőpotenciál és az agyi vérátáramlás változásait (4.2. fejezet).

Tízperces alapszakasz felvétele után az iszkémiát 30 percig tartottuk fenn, majd az artériák elzárását megszüntettük, és a monitorozott változókat további 1 órán át regisztráltuk. A kísérletek végén a szívet a farokartériás kanülön keresztül 5 ml levegő embólus beinjektálásával állítottuk meg, majd a regisztrációt további 10 perc után fejeztük be. Az RH-1838 és LASCA képsorokon tetszőlegesen kiválasztott ROI-k segítségével egy pontanalízist, majd teljes kép analízist végeztünk (5.2. fejezet).

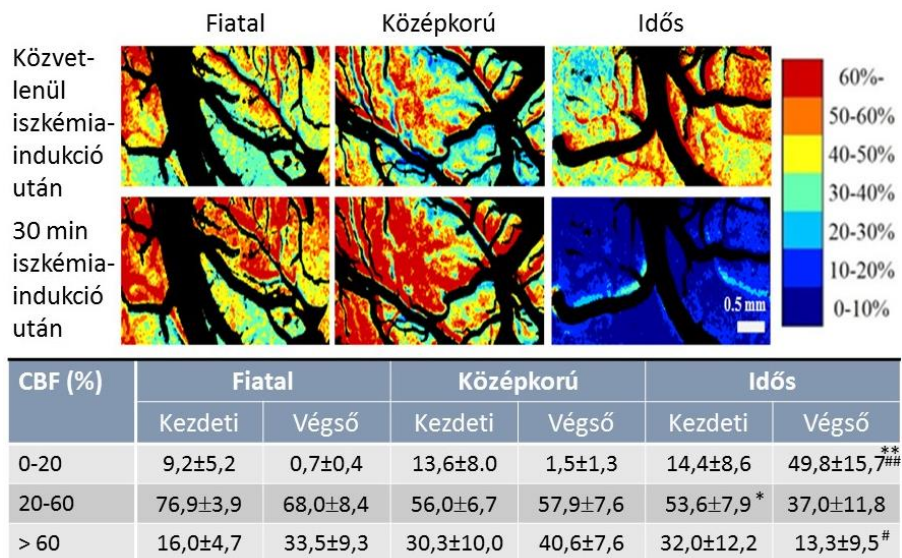
A nem-parametrikus adatokat (az SD-k számát) medián és kvartilisekként kifejezve, a teljes kép analízis eredményeit átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízist SPSS szoftvertben (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.) végeztük. A nem-parametrikus adatsorokra rangokon végzett ANOVA-t és Student-Newman-Keuls vagy Kruskal-Wallace próbát, a parametrikus adatokra egyszempontos ANOVA modellt, majd Fisher-féle post hoc tesztet alkalmaztunk ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$).

Perfúziós változások az iszkémiás periódus során

A 7.3.1. fejezetben egy pont analízissel leírtuk, hogy globális előagyi iszkémia során az idős agyban az érelzárást követő 40 perc alatt a kérgi CBF fokozatosan csökken, míg a fiatal állatokban szinten marad. Az elvégzett teljes kép analízis szerint a fokális iszkémia modellben a fiatal állatokban a perfúzió csökkenése megközelítőleg egységesen érintette a feltárt agykérget; az iszkémia kiváltása után rövid idővel a legtöbb pixel értéke a 20-60 % közötti CBF tartományba esett (a látótér $76,9 \pm 3,9$ %-a) (7.3.4. ábra). A középkorú, és különösen az idős csoportban azonban a 20-60 % közötti perfúziós tartomány részesedése kisebb felszín érintett ($56,0 \pm 6,7$ és $53,6 \pm 7,9$ %; középkorú és idős) a 20 % alatti és a 60 % feletti CBF tartomány javára, tehát az idősebb korcsoportokban a perfúziócsökkenés a látótérben kevésbé volt egységes és egyenletes (7.3.4. ábra). A 30 perces iszkémiás inzultus végére a kérgi keringés térbeli mintázata átrendeződött. Míg a fiatal és középkorú csoportokban a 20 % alatti áramlási sávba eső kérgi felszín elhanyagolható arányúra csökkent ($9,2 \pm 5,2$ -ről $0,7 \pm 0,4$ %-ra és $13,6 \pm 8,0$ -ról $1,5 \pm 1,3$ %-ra; fiatal és középkorú), addig az idős állatokban a drasztikusan hipoperfundált felszín a látótér felét lefedve meghatározó mértékben növekedett ($14,4 \pm 8,6$ -ról $49,8 \pm 15,7$ %-ra) (7.3.4. ábra). A globális előagyi iszkémiában tett megállapításaink, melyek szerint az idős állatokban az iszkémiát okozó áramlásesés kompenzációja valószínűleg az SD-vel járó terjedő iszkémia miatt nem következik be (7.3.1. fejezet), hatványozottan igazolódott a fokális iszkémia modellünkben is (az SD-hez csatolt CBF válaszreakciók elemzését lásd alább).

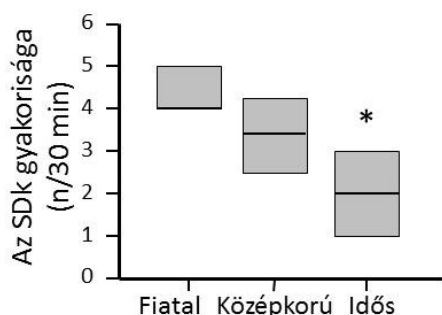
A terjedő depolarizációk mintázata

A felvételeken 20 állatban összesen 62 SD eseményt azonosítottunk; ezek közül 55 SD az iszkémia során, 7 SD a reperfúzió alatt jelentkezett. Az SD-eket tranziens vagy terminális típusba soroltuk. Fontos megállapítani, hogy ha a feszültségfüggő festékekkel nyert felvételek teljes-kép analízise során egy adott pixelen terminális SD-t regisztráltunk, a későbbiekben azon a pixelen további SD nem jelentkezett. A 30 perces iszkémiás periódus alatt az idős csoportban jelentősebben kevesebb SD alakult ki, mint a fiatal és középkorú csoportokban (7.3.5. ábra).



7.3.4. ábra. Perfúziós sávok relatív területi megoszlása az iszkémiás parietális kérgen kialakított látótéren a három korcsoportban (Fiatal, Középkorú, Idős). A perfúziós sáv tartományokat az alap agyi vérátáramláshoz (cerebral blood flow, CBF) képest (100 %) relatív formában adtuk meg, és a reprezentatív lézer-folt interferencia kontraszt analízissel kapott (laser speckle contrast analysis, LASCA) áramlási térképeken a színezéssel kódoltuk. Az eredményeket két választott időpontban, közvetlenül az iszkémia kiváltása után és 30 perccel később szemléltejük. A táblázatban kiemelt perfúziós sáv tartományokhoz (0-20, 20-60 és >60 %) tartozó területi lefedettség eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. Az adatokat statisztikailag ismételt ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$, vs. Fiatal; $p < 0,05^{\#}$ és $p < 0,001^{\#\#}$, vs. Kezdeti).

Az idős csoportban számottevően kevesebb az SD alakult ki. Az előforduló események közül a terminális SD-k elsősorban az idős csoportban, míg a tranzienst SD-k jellemzően a fiatal és a középkorú csoportban jelentkeztek (7.3.1. táblázat). Ezek alapján elképzelhető, hogy az idős csoportban azért alakult ki kevesebb SD, mert azok zöme terminális eseménynek bizonyult. Az SD gyakoriságát az idős csoportban továbbá az is csökkentette, hogy az életkorral emelkedett a kiválthatóság küszöb (7.1., 7.2. és 7.3.1. fejezet).



7.3.5. ábra. A terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD) száma állatonként, az iszkémia alatt, a három korcsoportra nézve (Fiatal, $n=7$; Középkorú, $n=6$; és Idős, $n=7$). Az adatokat átlag±kvartilis formában adtuk meg. Az adatok statisztikai értékeléséhez nem-parametrikus, rangokon végzett ANOVA-t és Student-Newman-Keuls post hoc próbát használtunk ($p < 0,05^*$).

A kiválthatósági küszöb életkortól függő emelkedésének oka lehet az idegszövet ingerelhetőségének gyengülése, mely a reaktív oxigén gyökök fokozott termelődésével, ezáltal a redox egyensúlyra érzékeny K^+ csatornák megváltozott működésével hozható összefüggésbe.^{24,337} Az oxidatív stressz módosítja az SD kialakításában részt vevő feszültségfüggő K^+ csatornák és BK csatornák oligomereinek felépülését, kapuzását és permeabilitását.³³⁷ Hasonlóképp, az SD terjedésében szerepet játszó NMDA receptorok is érzékenyek a szabadgyökök emelkedő koncentrációjára.^{23,93} Funkciójuk sérülése az öregedés folyamán tetten érhető a szinaptikus ingerületátvitel hatékonyságának gyengülésében, és a kognitív képességek romlásában.²¹² Végül az idős agyban az NMDA receptorok NR2A és NR2B szabályozó alegységei, amelyek az SD lefolyásában bizonyítottan szerepet játszanak,^{339,407} kisebb mértékben fejeződnek ki mind RNS, mind fehérje szinten.^{212,243,424}

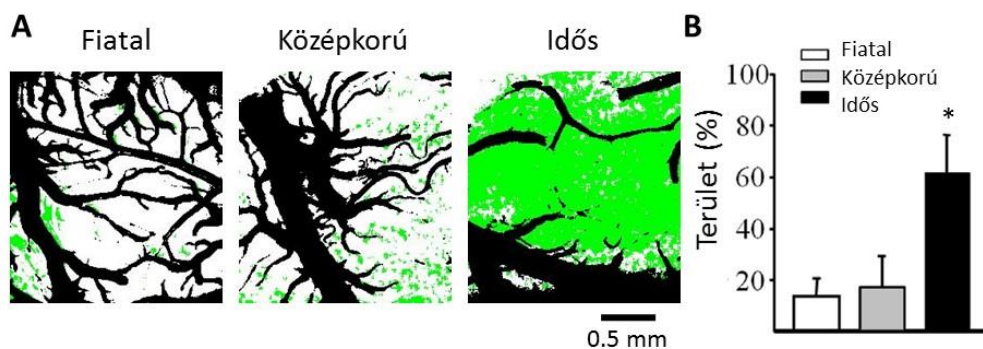
7.3.1. táblázat. A terjedő depolarizációk (spreading depolarization, SD) és a csatolt agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) válasz típusai a vizsgált korcsoportok szerint.

Korcsoport	SD típusa						
	Tranziens				Terminális		
	CBF válasz típusa						
	Hiperémiás		Nincs	Hipoperfúziós		Hipoperfúziós	
n	Mértéke (%)	n	n	Mértéke (%)	n	Mértéke (%)	
Fiatal	21	34,5±13,8	5	-	-	2	-22,2±15,7
Középkorú	12	41,2±17,1	4	1	-17,2	1	-30,0
Idős	3	27,0±12,0	3	-	-	7	-32,7±11,1

A CBF értékeket az iszkémia indukciója előtt felvett alaphoz (100 %) viszonyítva adtuk meg. Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg.

A teljes kép analízis módszerével azt is meghatároztuk, hogy feszültségfüggő festék fluoreszcenciáján alapuló képsorokon a látható kérgi felszín mekkora hányadát érintette tranziens, illetve terminális SD. Az analízishez minden csoportban közel azonos kérgi felszint (i.e. a csontszélek, a visszahajtott *dura mater* és a piális érhálózat kitakarása után visszamaradt terület; **7.3.6. ábra, A panel**) vettünk figyelembe (2,9±1,5 vs. 2,2±0,6 vs. 2,6±0,6 mm²; idős vs. középkorú vs. fiatal). A tranziens SD-k a fiatal és középkorú csoportban egymáshoz hasonló, míg az idős csoportban jelentősen kisebb kérgi területre terjedtek rá (34±15 vs. 82±8 vs. 91±5 %; idős vs. középkorú vs. fiatal). Ennek megfelelően a terminális SD-k az Idős csoportban érintették a legnagyobb felszint (62±15 vs. 17±12 vs. 14±7 %; idős vs. középkorú vs. fiatal) (**7.3.6. ábra**).

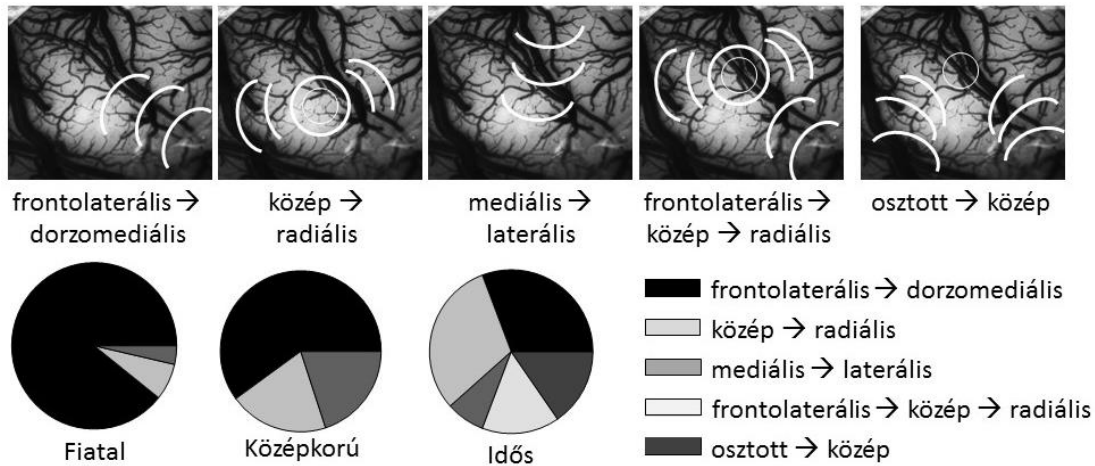
Az idős csoportban tehát nagyobb eséllyel alakult ki terminális SD, amit igazolt a terminális SD-ben részt vevő kérgi terület kiterjedésének növekedése is. Az SD utáni repolarizációt a neuronok és az asztrociták Na^+/K^+ pumpái segítik,^{96,230} melyek aktivitása az idős agyban csökken.^{27,44,68,83,204} Eredményeink összhangban állnak azzal a megfigyeléssel is, mely szerint a Na^+/K^+ pumpa iszkémiát követő hiperaktivitása az idős agyra kisebb mértékben jellemző, mint a fiatalra.⁴⁰⁰ Elképzelhető, hogy a terminális SD hangsúlyozottabb előfordulása a Na^+/K^+ pumpa öregedéssel kapcsolatos funkció-romlásának következménye.



7.3.6. ábra. A terminális terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) kiterjedése az RH-1838 képsorokon, a teljes kép analízis módszerével jellemezve. **A:** Reprezentatív depolarizációs térképek a terminális SD-k kiterjedésének szemléltetésére a három vizsgált korcsoportban. A fekete pixelek a kítakart, analízisből kizárt területet ábrázolják (i.e. piális érhálózat). A zölddel színekódolt pixelek részt vettek a terminális SD-ben, míg a fehéren hagyott pixelekre nem terjedt rá a terminális SD. **B:** A terminális SD-ben részt vevő terület aránya a teljes hasznos kérgi területhez képest. Az eredményeket átlag±stdev formában fejeztük ki. Az adatok statisztikai értékeléséhez ANOVA-t és Student-Newman-Keuls post hoc próbát használtunk ($p < 0,05^*$).

A multimodális képalkotó módszer lehetővé teszi, hogy megbízhatóan értékeljük az SD-k hullámfrontjának alakját, a terjedés irányát, és sebességét. A hullámfront alakja szerint megkülönböztettünk (i) egyenes, szabályos, a teljes látótérben áthaladó, és (ii) szabálytalan, időnként osztott frontú, a látótér egy részére korlátozó SD-eket (**7.3.7. ábra**). Az idős állatokra a szabálytalanul terjedő SD mintázat volt jellemző (az összes esemény 70 %-a), míg a fiatalok esetén gyakoribbak voltak a látótérben szabályosan átvonuló SD-k (az összes esemény 64 %-a). A megfigyelt terjedési mintázatokat a **7.3.7. ábra** mutatja be. A fiatal és középkorú csoportokban az SD-k zöme frontolaterális irányból lépett be a látótérbe (80 vs. 89 %; középkorú vs. fiatal), összhangban a korábban a multifokális és a globális előagyi iszkémia modelljeinkben megfigyeltekkel (4.2., 5.2. és 5.3. fejezet). Néhány alkalommal a látótérre esett az SD fókuszja, és a terjedés radiális irányt mutatott (20 vs. 7 %; középkorú vs. fiatal), vagy a látótér mediális szélétől laterális irányba haladt (0 vs. 4 %; középkorú vs. fiatal). Az idős állatokban az SD terjedési mintázata sokkal változatosabbnak mutatkozott. Több esetben az eltérő irányból egyidejűleg érkező hullámok a látótér közepén egybeolvadtak, majd kioltódtak (14 %), vagy a látótér közepe felé haladó SD a központi zónában ketté oszlott, és eltérő irányokba haladt tovább (43 %) (**7.3.7. ábra**). Az idős agyban a fiatalra jellemző, megközelítőleg egységes, domináló, frontolaterális fokális zónától eltérően az SD-k kiindulási pontja véletlenszerűen váltakozott. A változatos mintázat az idős agyban jelezhetette az iszkémia inhomogenitását, illetve egyidejűleg több iszkémiás góc kialakulását. Ezt valószínűsíti az a megfigyelés is, hogy az SD az iszkémiás mag régiót elkerüli, annak peremén halad el.²⁶⁹

A terjedés sebességére az életkor nem volt hatással ($2,19 \pm 0,28$ vs. $2,65 \pm 0,16$ vs. $2,81 \pm 0,16$ mm/s; idős vs. középkorú vs. fiatal). Érdekes megjegyezni, hogy a terjedési sebesség becslése képsorok alapján sokkal realisabb, mint a két-pontos elektrofiziológiai elvezetéssel számolt eredmények. Ha a két elvezetési pont közötti távolság és idő révén számolunk terjedési sebességet, és az SD a két pont között nem a legrövidebb utat teszi meg, a valósánál lassabb SD terjedésre következtetünk. A képalkotó módszer ezzel szemben figyelembe tudja venni a terjedés változó, aktuális irányát.



7.3.7. ábra. A terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD) iránya és mintázata (representatív ábrázolások), és a mintázattípusok előfordulási gyakorisága (kördiagrammok) a három kísérleti korcsoportban. A felvételek zöld megvilágítás mellett (540-550 nm) készültek. A felvételeken a fehér vonalak sematikus jelölik a megkülönböztetett SD terjedési mintázatokat.

A vérátáramlási válaszok típusai, életkori sajátosságai

Az SD-hez csatolt CBF változód típusait egy pont-analízis révén értékeltük (7.3.1. táblázat). A fiatal csoportban leggyakrabban előforduló tranziens SD-k (n=26) többnyire hiperémiás CBF válaszreakciót vontak maguk után (a hiperémia mértéke: $34,5 \pm 14\%$, n=21), illetve elvéte értékelhető CBF változás nélkül terjedtek tova (n=5). A fiatal csoportban mindössze két terminális SD-t figyeltünk meg, melyekkel hipoperfúzió járt együtt (a hipoperfúzió mértéke: $-22,2 \pm 16\%$). A fiatal állatokhoz hasonlóan a középkorú csoportban is a tranziens SD-k (n=17) és a hozzájuk társuló hiperémiás CBF változások voltak a legjellemzőbbek (a hiperémia mértéke: $41,2 \pm 17\%$, n=12). Négy esetben nem alakult ki CBF változás, egy esetben pedig hipoperfúziót figyeltünk meg (mértéke: $-17,2\%$). A középkorú csoportban egy alkalommal jelentkezett terminális SD, amelyhez hipoperfúzió társult (mértéke: -30%). Bár az idős csoportban mindössze 13 SD-t figyeltünk meg, ezek fele (n=7) terminálisnak bizonyult, melyet hipoperfúzió, azaz terjedő iszkémia kísért (mértéke: $-32,7 \pm 11\%$). Végül az idős csoportban megfigyelt három tranziens SD-t követően nem tapasztaltunk CBF változást, másik három esetben mérsékelt hiperémia alakult ki (mértéke: $27,0 \pm 12\%$).

Eredményeink a 7.3.1. fejezetben bemutatottakkal összhangban azt bizonyítják, hogy az iszkémiának kitett öregedő agyban jelentősen nő az SD-hez társuló terjedő iszkémia előfordulásának esélye. A 6.3. és a 7.3.1. fejezetben megbeszéltek szerint a terjedő iszkémia kialakulásának hátterében az állhat, hogy az agyi értónus-szabályozás hatékonysága az öregedés során romlik. Az idős agyban az SD-vel a terjedő iszkémia kialakulásának kedvezhet a fokozottabb oxidatív stressz, amely háttérbe szorítja a vazodilatátor mechanizmusokat és csökkenti a Na^+/K^+ pumpa aktivitását. Mindezek eredőjeként lassulhat az extracelluláris K^+ visszavétele, és teret nyerhetnek a vazokonstriktív mechanizmusok.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Az öregedés és az SD kölcsönhatását célzó kutatásaink egyedülállóak, így meghatározó és központi jelentőségűek. Munkánk során bizonyítottuk, hogy bár az SD-k előfordulása az idős agyban kevésbé valószínű, a megjelenő események mégis súlyosabb neurodegenerációt vonhatnak maguk után, melyet elektrofiziológiai megközelítésben a repolarizáció késlekedése, vagy teljes elmaradása jelöl. Az öregedés az SD-hez társuló CBF változásokat is kedvezőtlenül

érinti. Amennyiben az idős agyban az SD-vel áramlásfokozódás jár, annak mértéke alul marad a fiatal agyban tapasztaltnál képest. Végül az idős agyban jelentősen megnő a terjedő iszkémia kialakulásának valószínűsége, mely tartósan alacsony perfúziót okoz. Valószínű, hogy a bemutatott vazokonstriktív irányba tolódó áramlási válaszok jelentősen hozzájárulnak az iszkémiás infarktus idős agyra jellemző, fokozott növekedéséhez.^{12,299}

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemények:

Menyhárt Á, Makra P, Szepes BÉ, Tóth OM, Hertelendy P, Bari F, Farkas E. High incidence of adverse cerebral blood flow responses to spreading depolarization in the aged ischemic rat brain. Neurobiol Aging. 2015;36(12):3269-3277.

Clark D, Institoris Á, Kozák G, Bere Z, Tuor U, Farkas E, Bari F. Impact of aging on spreading depolarizations induced by focal brain ischemia in rats. Neurobiol Aging. 2014;35(12):2803-2811.

7.4. Az agykérgi terjedő depolarizációhoz csatolt pH változások módosulása az idős agyban

Az előző, 7.3 fejezetben megállapítottuk, hogy idős korban az SD azért jelent fokozott veszélyt a stroke által okozott károsodás kimenetelére nézve, mert az SD-t az idős hipoperfundált agyban nagyobb gyakorisággal követi terjedő iszkémia. Azonban nem mérlegeltük, hogy az SD-hez társuló hiperémiás válaszok hordoznak-e magukban további kockázatot. Az 5.4. fejezetben bemutattuk, hogy az SD-vel számottevő szöveti acidózis alakul ki hiperémiás áramlási válasz mellett. Eredményeinkre építve az a hipotézis fogalmazódott meg, hogy az idős agyban az SD-vel járó szöveti pH csökkenés kifejezettebbé válhat, ami további kedvezőtlen feltételeket teremt a penumbra régió regenerációjához. A 6.2. fejezetben rámutattunk arra is, hogy az SD-hez társuló szöveti acidózis mértéke ép szövetben összefügg az SD-hez csatolt hiperémia amplitúdójával, míg iszkémia során a hiperémia amplitúdójával nem, hosszával viszont jól korrelál. Kérdésként merült fel tehát, hogy idős agyban módosul-e a szöveti pH és a hiperémia kapcsolata. A hipotézis igazolására és a kérdés megválaszolására korábbi kísérleteinket idős patkányokban is megismételtük.

Módszerek

Kísérleteinket fiatal felnőtt (2 hónapos, n=20), és idős (18 hónapos, n=18), hím, Sprague-Dawley patkányokon végeztük (n=20). A kísérleti állatok előkészítését, a pH-szenzitív mikroelektródák alkalmazását, ezzel egyidejűleg a lézer-Doppleres áramlásmérést, és a szöveti pH-t és CBF változásokat monitorozó optikai képalkotó eljárást a 4.3. fejezetben részletesen ismertettük. A globális előagyi iszkémia kialakítására a CCA-t mindkét oldalon kipreparáltuk (5.3. fejezet), majd horgászdamlából készített okklúdereket fűztünk az erek köré, hogy az artériákat a kísérleti protokoll egy adott fázisában elzárjuk. Az állatok egy csoportjában az agykérgi pH változásokat ionszenzitív mikroelektródával, egy másik csoportban pH alapú multi-modális képalkotással regisztráltuk (4.3. fejezet).

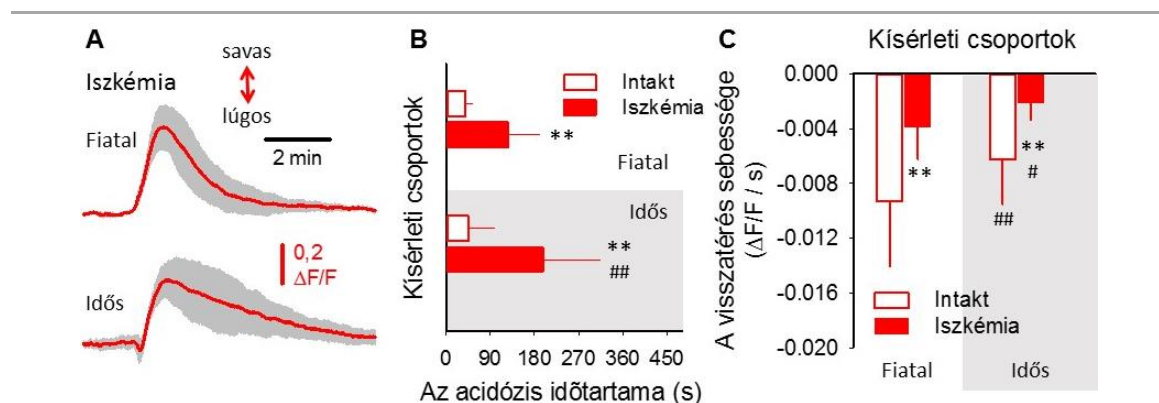
Ötven perces alapszakasz felvétele után a CCA-kat elzártuk (2VO), majd egy óra elteltével az érelzárás feloldásával reperfúziót hoztunk létre. A kísérleteket egy újabb óra elteltével izoflurán túladagolásával fejeztük be. A kísérlet három fázisa során (alap, iszkémia, reperfúzió) 15 perces időközönként 3-3 SD-t váltottunk ki (4.3. fejezet) (5.4.1. ábra). A kísérletek egy részében a 2VO után percekben belül egy spontán SD is megjelent (7.4.2. ábra).

A részletes analízis során a spontán kialakuló és a kísérletesen kiváltott SD-eket külön értékeltük. A kísérletesen kiváltott eseményeket a kísérletek két szakaszára nézve (alap, iszkémia) hasonlítottuk össze, tekintve, hogy a reperfúzió fázisában a pH-indikátor festék (Neutral red, NR)

nem adott optikai jelet. A kapott eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. A statisztikai analízishez SPSS szoftvert használtunk (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, IBM Corp., U.S.A.). A statisztikai értékeléshez egyszempontos ANOVA-t használtunk, melyet Fisher post hoc teszt követett ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$). Az SD-t jelző DC potencial-kitérés, az SD-vel járó acidózis, és a következő hiperémia amplitúdója és időtartama között átfogó korrelációs analízist végeztünk. Az adatsorok közötti összefüggések értékeléséhez kétoldali Pearson-féle korrelációs tesztet alkalmaztunk ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, IBM Corp.).

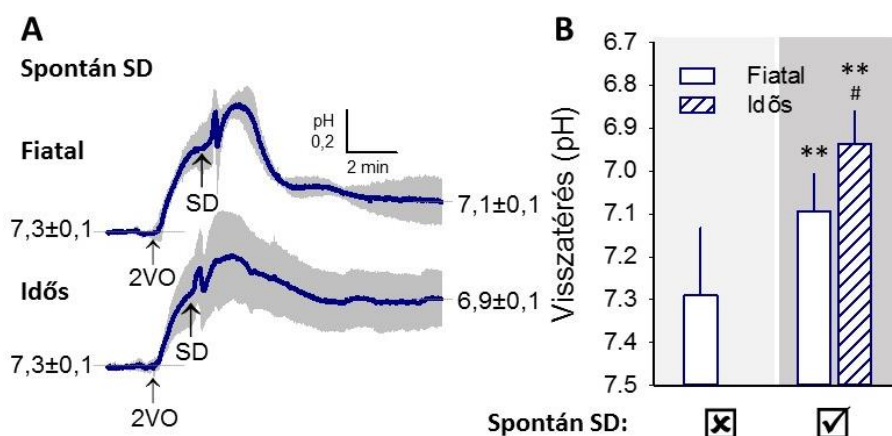
Az idős agyban az SD után a szöveti pH rendeződése elégtelen

A képpalkotással végzett kísérletek tanúsága szerint a kísérletesen kiváltott SD-vel járó acidózis maximuma az idős állatokban nem tért el a fiatalokétól. Bár az életkor optimális kérgi perfúzió mellett („intakt”) az SD-vel járó acidózis hosszát sem befolyásolta, iszkémiás körülmények között az idős agyban az acidózis jelentősen hosszabb ideig maradt fenn ($197,2 \pm 116,7$ vs. $127,5 \pm 64,2$ s, idős vs. fiatal) (7.4.1. ábra, A-B panel). A szöveti pH rendeződésének hatékonyságát az acidózis csúcserékét követő visszatérés rátájával jellemeztük (i.e. a görbe egyenes szakaszán mért meredekség). A visszatérés sebessége az idős állatokban mind intakt ($0,006 \pm 0,003$ vs. $0,009 \pm 0,005$ $\Delta F/F/s$, idős vs. fiatal), mind iszkémiás kondíció mellett jellegzetesen csökkent ($0,002 \pm 0,001$ vs. $0,004 \pm 0,002$ $\Delta F/F/s$, idős vs. fiatal) (7.4.1. ábra, C panel).



7.4.1. ábra. Az idős agyban a terjedő depolarizációval (spreading depolarization, SD) járó szöveti acidózis elhúzódik. **A:** Az SD-vel járó szöveti pH-változás a kísérlet iszkémia szakaszában a két életkorcsoportban. A vonaldiagramokat, amelyek az optikai képpalkotás eredményeként kapott pH változásokat tüntetik fel, a kísérletekből származó SD-k átlagaként ábrázoltuk (átlag±stdev; n=6/8). **B:** Az alap szakasz (intakt) és az iszkémia során kiváltott SD-vel járó szöveti acidózis fél amplitúdónál mért időtartama. **C:** A visszatérés sebessége az SD-vel járó szöveti acidózisból az alap szakasz (intakt) és az iszkémia során. Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. Az adatokat statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$, vs. Fialat; $p < 0,05^{\#}$ és $p < 0,001^{##}$, vs. Intakt).

Az iszkémia indukciója utáni percekben, spontán kialakuló SD-k amplitúdójában nem jelentkező életkorral összefüggő eltérés. Az elektrofiziológiai kísérletekben mért pH értékek szerint a spontán SD a fiatal csoportban átlagban pH $6,48 \pm 0,16$ -re, az idős csoportban pH $6,76 \pm 0,20$ -ra mélyítette a szöveti acidózist. A spontán SD-k esetén (a kiváltott SD-kkel ellentétben) a szöveti pH a 15 perccel később kísérletesen kiváltott SD előtt nem tért vissza a kiindulási alap értékre. Az idős állatokban a fennmaradó, enyhe szöveti acidózis 10 perccel az SD elhaladása után jelentősebbnek bizonyult, mint a fiatalokban (pH $6,94 \pm 0,08$ vs. $7,09 \pm 0,09$, idős vs. fiatal) (7.4.2. ábra)

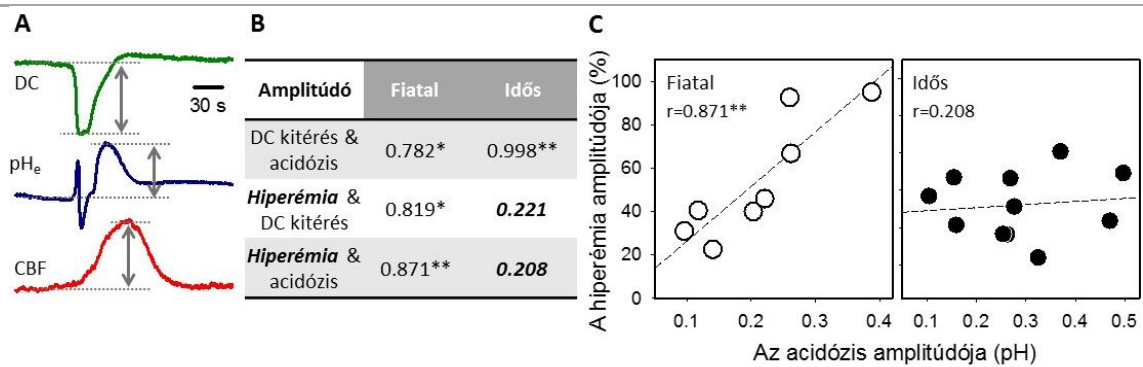


7.4.2. ábra. Az idős agyban a spontán terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) követően a szöveti pH savasabb szintre rendeződött, mint fiatalban. **A:** A vonaldiagramokat, amelyek pH-szenzitív mikroelektrodák révén kapott pH változásokat tüntetik fel, a kísérletekből származó SD-k átlagaként ábrázoltuk (átlag±stdev). Globális előagyi iszkiémiát kétoldali *arteria carotis communis* elzárással (two-vessel occlusion, 2VO) hoztunk létre. **B:** Az idős csoportban minden elektrofiziológiai kísérletben megfigyeltük a spontán SD kialakulását (☑), míg a fiatal állatok felénél ezt nem tapasztaltuk (☒). A grafikonok a spontán SD után 10 perccel tapasztalt szöveti pH szintet ábrázolják. Az eredményeket átlag±stdev formában adtuk meg. Az adatokat statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p < 0,01^{**}$, vs. ☒; $p < 0,05^{\#}$, vs. Fiatál).

Mint a 6.2. fejezetben tárgyaltuk, az SD-vel járó tranziens acidózis időtartamának növekedése, illetve az SD után fennmaradó, enyhébb fokú acidózis is sejtkárosító lehet, hiszen az acidózis által indukált sejtkárosodás mértéke acidózis fennállásának hosszával arányosan nő.²⁷² Eredményeink szerint az idős, iszkiémiás agyban az SD-vel járó szöveti acidózis elhúzódik, illetve SD után a szöveti pH rendeződése elégtelen. Feltételezhető, hogy az idős agyban még a hiperémiával járó, ismétlődő mintázatban előforduló SD-k is szövetkárosító hatásúak, hiszen tartósan egy a fiziológiásnál savasabb környezetet tartanak fenn, és ezzel veszélyeztethetik a penumbra szövet túlélési esélyeit.

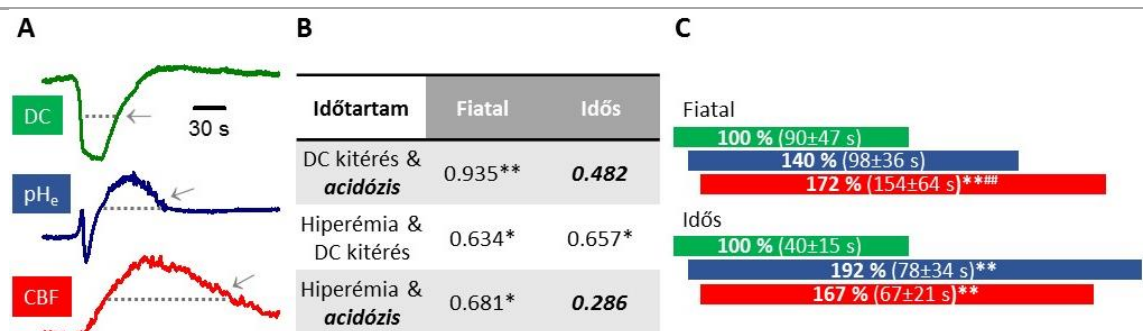
Az idős agyban az SD-hez társuló szöveti acidózis és hiperémia közötti összefüggés gyengül

A 6.2. fejezetben ismertetett korrelációs analízis szerint, míg a fiatal állatok intakt agykérgében az SD-vel járó hiperémia amplitúdója egyenes arányosságot mutatott a DC potenciál változás nagyságával és az acidózis mértékével ($r = 0,819^*$ és $0,871^{**}$), addig az idős csoportban ilyen összefüggéseket nem találtunk. A DC kitérés csúcsának és az acidózis mértékének összefüggése viszont idős korban is meggyőzően szorosnak bizonyult ($r = 0,998^{**}$) (7.4.3. ábra).



7.4.3. ábra. Az életkor hatása a terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) jelző DC potenciál kitérés, a társuló szöveti acidózis, és a hiperémia mértéke közötti összefüggésre az intakt patkány agykéregben. **A:** Az értékelt változók elektrofiziológiával (DC potenciál és pH-szenzitív mikroelektroda) és lézer-Doppleres áramlásméréssel (cerebral blood flow, CBF) nyert megjelenítése egy reprezentatív eseményre nézve. **B:** A kétoldali Pearson korrelációval kapott koeficiensek áttekintése ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$). **C:** Az életkor hatását az acidózis és a hiperémia maximuma közötti összefüggésre reprezentatív korrelációs grafikonok szemléltetik ($n=8/10$; $p<0,01^{**}$).

Az életkor hatása a vizsgált változók időtartamának viszonyára iszkémia során jelentkezett szembetűnően. A fiatal csoportban a DC potenciál-kitérés, az acidózis és a hiperémia hossza jól korrelált egymással (7.4.4. ábra). Az idős állatokban azonban az acidózis időtartama függetlenné vált a DC potenciál-kitérésétől ($r=0,482$) és a hiperémiáétól is ($r=0,286$) (7.4.4. ábra, C panel). Míg a fiatal állatokban az acidózis hossza 40 %-kal haladta meg a DC potenciál-kitérés hosszát, az idős csoportban az acidózis időtartama majdnem megduplázódott a DC potenciál-kitéréshez képest. Feltűnő életkorbeli különbség volt az is, hogy míg a fiatal állatok estén a hiperémia hossza arányában túlnyúlt az acidózis időtartamán, addig az idős csoportban az acidózis bizonyult hosszabbnak a hiperémiához képest.



7.4.4. ábra. Az életkor hatása a terjedő depolarizációt (spreading depolarization, SD) jelző DC potenciál kitérés, a társuló szöveti acidózis, és a hiperémia időtartama közötti összefüggésre az iszkémiás patkány agykéregben. **A:** Az értékelt változók elektrofiziológiával (DC potenciál és pH-szenzitív mikroelektroda) és lézer-Doppleres áramlásméréssel (cerebral blood flow, CBF) nyert megjelenítése egy reprezentatív eseményre nézve. **B:** A kétoldali Pearson korrelációval kapott koeficiensek áttekintése ($n=8/11$; $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$). **C:** Az SD-vel járó acidózis és hiperémia relatív időtartama a DC potenciál kitérés időtartamához viszonyítva (100 %) iszkémia során. A vízszintes oszlopok színekódja az A panel-t követi (i.e. DC potenciál: zöld, szöveti pH: kék, CBF: piros). Az oszlopokban jelölt relatív értékeket a zárójelben megadott abszolút értékekből számoltuk (mean±stdev; $n=8-11$). Az adatokat statisztikailag egyszempontos ANOVA, majd Fisher-féle post hoc teszt alkalmazásával értékeltük ($p<0.01^{**}$, vs. DC potenciál; $p<0.01^{###}$, vs. acidózis).

A korrelációs vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy az idős agyban az SD által okozott acidózisból késlekedik a visszatérés. Az SD-vel járó acidózis hátterében az irodalmi adatok alapján a laktát felhalmozódása jár,^{267,332,335} amit az idős agyban a korlátozott laktát-eltávolítás okozhat. A laktátot a cerebrovaszkuláris endothélszöveteken elhelyezkedő monokarboxilát-transzporter-1 (MCT1) facilitált diffúzióval juttatja az interstíciumól a véráramba.²⁹⁶ Egy régi tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy iszkémiás stroke esetén az MCT1 diszfunkciója hozzájárulhat az acidózis által okozott neurodegenerációhoz.¹¹⁰ A fejlődő agyban az MCT1 kifejeződése erősen életkorfüggőnek bizonyult.²⁹¹ Arra nézve viszont nincs adat, hogy az MCT1 expressziója vagy aktivitása miként módosulhat öregedés során. Elképzelhető, hogy az MCT1 életkorral összefüggő csökkent kifejeződése vagy diszfunkciója hátráltathatja az idős agyban az SD során felhalmozódott laktát eltávolítását, ami gyorsabb ütemű neurodegenerációt eredményezhet. Ha ez az elképzelés igazolódna, az MCT1 funkciójának javítása terápiás célpont lehetne, amit további kutatások tárgyát képez.

Az eredmények újszerűsége, a kutatás távlatai

Munkánk során rávilágítottunk arra, hogy SD-t követően az idős agyban késléssel valósul meg a szöveti pH rendeződése a fiziológiás értékre. Ez a megfigyelés olyan lehetséges sejtkárosító folyamatot tár fel, amely az idős agyban az SD-hez társuló hiperémia mértékétől függetlenül is veszélyeztetheti az iszkémia által érintett szövet túlélésének esélyét.

A fejezethez vonatkozó eredeti közlemények:

Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Orsolya MT, Szepes BÉ, Tóth R, Ivánkovits-Kiss O, Obrenovitch TP, Bari F, Farkas E. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. Sci Rep. 2017;7(1):1154.

Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Bari F, Farkas E. Age or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarization in the rat brain. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017;313(2):H328-H337.

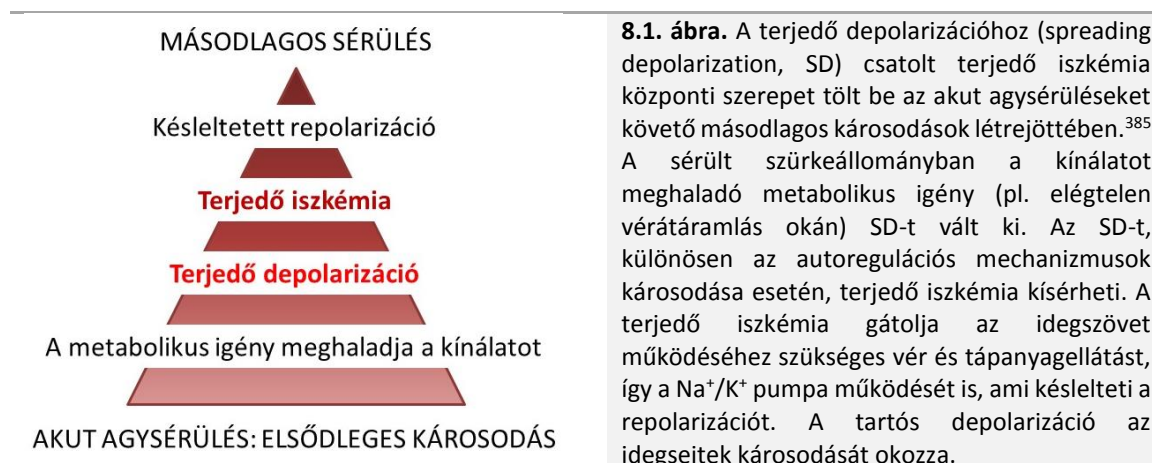
8. Összefoglalás, kutatásaink távlatai

A dolgozat az elmúlt tíz év kutatómunkájának – melynek középpontjában az SD vizsgálata állt – eredményeit tekinti át tematikus rendben. Mint arra a korábbiakban rámutattunk, az SD összetett ideglettani/kórtani jelenség, amely meghatározó szerepet játszik az akut agysérüléseket követő másodlagos károsodások kialakulásában.^{96,107,164}

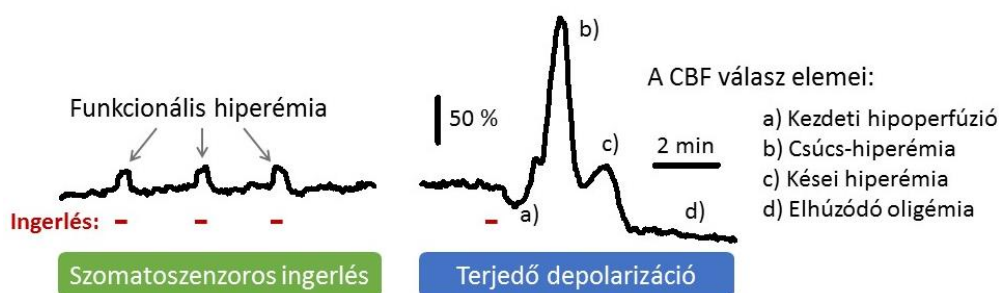
A bemutatott kísérletek kiindulópontja az volt, hogy megállapítsuk fokális iszkémia során az SD keletkezésének helyét az iszkémiás mag régióhoz képest. Arra voltunk továbbá kíváncsiak, hogy miként járul hozzá az SD az iszkémiás lézió kiterjedéséhez. A megfogalmazott célkitűzések eléréséhez kialakítottunk egy egyedi, nagy látószögű, kísérletes képalkotó rendszert, mely lehetővé tette az SD-vel összefüggő események térbeli jellegzetességeinek megfigyelését (4. fejezet). A képalkotóeljárás több lépcsős fejlesztésével célunk volt az SD minél több jellemzőjének vizuális, egyidejű megjelenítése. A feszültségfüggő festék használatával elsőként tettük láthatóvá az agykérgi depolarizációt és annak dinamikus változását. Azon túl, hogy a készített képsorokon tetszőleges számú és pozíciójú ROI-ból nyerhető időbeli információ, a teljes-kép analízis módszerével a látótérben az áramlás térbeli eloszlásának értékelésére is alkalom nyílt (5.2. fejezet). Bár megközelítésünk sok szempontból lényeges előrelépést jelentett az egy-pont elvezetésekhez (pl. beültetett elektróda) képest, legerősebb korlátja az maradt, hogy jellegénél fogva csak a kérgi felszín vizsgálatára alkalmas, mélység információ nem nyerhető vele. Ehhez képest előrelépést jelent a két- vagy multi-foton mikroszkópia módszere, mely a kéreg

mélyebb rétegeibe is betekintést enged (6.3. fejezet). A két-foton mikorszópia további sajátossága a nagy felbontás révén nyerhető részletgazdagság, bár ez a látótér jelentős csökkenése mellett érhető el. A nagy felbontás fontos előnye, hogy kedvez a sejtszintű szabályozó mechanizmusok tanulmányozásának (6.3. fejezet). Bár a két-foton mikorszópia a kéreg mélyebb rétegeinek vizsgálatára is lehetőséget ad, a kéreg alatti struktúrák *in vivo* megjelenítése optikai elven működő képalkotással továbbra is kihívást jelent, és csak a kéreg részleges eltávolításával oldható meg.^{143,264} Ezt a problémát oldja fel az MRI célzott használata, mely a legfrissebb tanulmányok szerint alkalmas az iszkémiás infarktus növekedésén túl az SD időbeli és térbeli követésére is. Dinamikus T2-súlyozott MRI módszerrel például főemlősökben igazolták, hogy embolizációval létrehozott agyi érelzáródás SD kialakulását vonja maga után.⁷⁴ Diffúzió-súlyozott MRI vizsgálattal egerekben azt mutatták meg, hogy az SD tovaterjedése az agykéregről a kéreg alatti szürkeállományra (pl. striátum) farmakológiai úton meggátolható.³⁸ Végül funkcionális MRI vizsgálatok segítségével bizonyították az NMDA receptor NR2B alegységének szerepét az SD kiváltásában és terjedésében.³³⁹ Képalkotó eljárásunk azonban továbbra is egyedi lehetőséget kínál az SD és a hozzá kapcsolható folyamatok tanulmányozására, hiszen a beépített modalitások révén lehetőséget teremt az SD és a velejáró hemodinamikai és metabolikus változások tér- és időbeli kapcsolatának feltárására.

Az eredeti célkitűzésekre válaszul azt a megfigyelést tettük, hogy az SD kialakulásához egy a penumbra jellemző áramlási küszöb rendelhető (5.2. fejezet), melyet például hipertenzív patkányokban a fokális iszkémia létrehozása utáni percekben ~40 ml/100 g szövet/min abszolútértékben határoztak meg.³⁷⁴ Eredményeink alapján megállapítható, hogy fokális iszkémia során az SD a penumbra régió területén jön létre, és onnan terjed tovább. További kutatások alátámasztották ezt a nézetet, illetve kiegészítették azzal, hogy az SD kialakulásához a szövet fokozott lokális oxigén-felhasználása, valamint hipotenziós tranziensek teremtenek kedvező feltételeket (8.1. ábra).⁴⁰³ Ez utóbbi egybeesik azzal, hogy globális előagyi iszkémia modellünkben az SD az iszkémiát súlyosbító hipovolémiás hipotenzióra válaszul, az autoregulációs tartomány elhagyásakor jelent meg (5.3. fejezet). Az autoregulációs sáv elhagyásakor keletkező SD-khez kísérleteinkben rendszerint terjedő iszkémia társult (5.3. fejezet), ami alajpján az autoregulációs diszfunckió a szövetkárosító terjedő iszkémia rizikófaktorának tekinthető. A hipotézist jelentősen megerősíti az a klinikai tanulmány, mely zárt koponyasérülést elszenvedett betegekben a terjedő iszkémiát szintén az elégtelen autoregulációhoz kötötte.^{176,385} A terjedő iszkémia ugyanakkor az SD-vel összefüggésben kialakuló szövetkárosodás közvetítőjeként, kulcsszereplőjeként ismert, hiszen a metabolikus krízis elmélyítése révén késlelteti az SD utáni repolarizációt (8.1. ábra).⁹⁶ A repolarizáció késése, a hosszan elhúzódó depolarizáció pedig egyrészt hozzájárul a másodlagos sérülések kialakulásához (8.1. ábra), másrészt a neurodegeneráció és a neurológiai károsodás súlyosbodását jelzi.^{108,164}



Mivel a terjedő iszkémia késlelteti a repolarizációt, globális iszkémia modelljeinkben (hipovolémiás hipotenzióval súlyosbított előagyi iszkémia, ill. szívmegállás) a spontán jelentkező depolarizáció hosszan elnyúló illetve terminális anoxiás depolarizáció volt (4.2.2. és 5.3. fejezet). Kísérleteink alapozták meg azt a mára már általánosan elfogadott véleményt, hogy az anoxiás depolarizáció (AD) az SD-hez hasonlóan terjed. Így a korábban a külön jelenségekként számon tartott AD, peri-infarktus depolarizáció, iszkémiás depolarizáció és SD ugyanazon ideglettani illetve kórfolyamat manifesztációja egy jól meghatározható spektrum mentén.^{107,164} Munkáink jelentősen befolyásolták az AD további jellemzőinek tanulmányozását.¹⁶⁴ Az elmúlt évben megjelent klinikai tanulmányok, elsőként bizonyították a terjedő AD jelenségét az emberi agyban, és felhívták a figyelmet az AD klinikai monitorozásának jelentőségére a neurológiai állapot felmérésének és az agyhalál megállapításának szempontjából.^{13,103} Jelenlegi kutatásaink is az AD-re koncentrálnak. Célunk, hogy AD során megismerjük az extracelluláris glutamát-felhalmozódás eredetét és idegsejtkárosító hatásának mechanizmusát.



8.2. ábra. A szomatoszenzoros ingerlésre (bajuszpárna-stimuláció) adott funkcionális hiperémia és a terjedő depolarizációhoz csatolt lokális agyi vérátáramlási (cerebral blood flow, CBF) közötti eltérések reprezentatív, alfa-kloralózzal altatott patkányból származó, eredeti felvételek szemléltetik (Szabó et al., 2019). A két felvétel skálázása (az idő és az áramlásváltozás mértéke) az összehasonlíthatóság érdekében azonos.

A terjedő iszkémiával összefüggő cerebrovaszkuláris szabályozás pontosabb megértése fontos lépést jelent a terjedő iszkémia, és az ennek következtében fellépő neurodegeneráció megelőzése szempontjából. Ugyanakkor az SD-hez csatolt „klasszikus” CBF változás mediátorainak pontosabb megismerése is további kihívásokat jelent (6. fejezet). Az SD-vel együttjáró CBF változások értelmezése során gyakran analógiának tekintik a szomatoszenzoros ingerlésre adott funkcionális hiperémia mechanizmusát,¹⁶ munkáink azonban számos vonatkozásban megkérdőjelezték ezt a nézetet. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy az átmeneti áramlásfokozódás e

két típusa között lényegi különbségek vannak a válasz fázisait, mértékét és következményeit tekintve (6.1.1. táblázat, 8.2. ábra).

A szabályozás megértését célzó munkáink kiindulópontja az volt, hogy az SD-t követő hiperémia jellegét tekintve inkább a reaktív, mint a funkcionális (6.0.1. ábra). A reaktív hiperémia iszkémiára, elsősorban vazoaktív metabolitok révén, *feed-back* módon kialakuló válaszreakció, míg a neurovaszkuláris csatolás *feed-forward* szabályozás eredményeként hoz létre áramlásfokozódást.¹⁹⁰ A két szabályozástípus között azonban nem lehet éles határvonalat húzni, mert az idegi aktivitás fokozódása is termel lokálisan értónust szabályozó metabolitokat. Az SD-hez csatolt CBF változások szabályozásának értelmezését nehezíti, hogy az SD markáns neurotranszmitter-felszabadulással, ionháztartásbeli és metabolikus változásokkal jár, melyek mind vazoaktív hatással bírnak.¹⁶ Ha az SD iszkémiás/hipoxiás agyban alakul ki, a CBF szabályozása még összetettebb, hiszen önmagában az iszkémia/hipoxia is vazoaktív metabolitok, laktát és adenzin, felszaporodást eredményez.

Munkánk során feltártuk, hogy az SD az iszkémiás agyban jelentősen növeli a szöveti acidózis mértékét, amely valószínűleg olyan környezetet teremt, ami növeli a szövetkárosodás lehetőségét (5.4. fejezet). Az SD vel összefüggésben kialakuló szöveti pH csökkenés mértéke ép keringésű agykéregben jól korrelált az SD-vel járó hiperémia amplitúdójával, míg iszkémás állapotban csak az acidózis és a hiperémia időtartama között találtunk értékelhető összefüggést (6.2. fejezet). Az SD-vel járó acidózis kialakulásában meghatározó jelentőségű a laktát felhalmozódása.^{132,267,332} A CBF szabályozásának szempontjából lényeges, hogy ismert az anaerob metabolizis során keletkező laktát értónusszabályozó tulajdonsága.¹¹ Érdekes összefüggés, hogy az extracelluláris K^+ kálium felhalmozódása (mely az SD egyik legismertebb jellemzője) elősegíti a laktát felszabadulását,^{11,354} ami a vazodilatátor PGE_2 visszavételéért felelős prosztoglandin-transzporter gátlásához vezet.¹⁴⁴ A folyamat eredménye, hogy a PGE_2 tartósabban fejtheti ki értágító hatását.

A PGE_2 forrását és szerepét a neurovaszkuláris csatolásban korábban meggyőzően tisztázták.^{11,42,216,406} Ugyanakkor az SD-hez társuló CBF változásokban játszott szerepére vonatkozóan csak közvetett bizonyítékok álltak rendelkezésre. A PGE_2 termelődésében részt vevő enzimek és a PGE_2 EP_4 receptorának farmakológiai gátlása révén sikerült bizonyítanunk, hogy a vazodilatáció PGE_2 útvonala jelentősen hozzájárul az SD-hez kapcsolódó hiperémia kialakulásához (6.1. fejezet). Az ép agykéregben azonosított szabályozási folyamat azonban iszkémia során nem jut érvényre (6.1. fejezet). Talán épp az értágító folyamatok háttérbe szorulása emeli ki iszkémiás agyban az SD-t követő CBF változás vazokonstriktív komponenseit, és magát a terjedő iszkémiát.²⁴

Az SD-hez kapcsolódó CBF változások modulálásában a vazokonstriktív prosztanoidok, például a prosztoglandin- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) részvétele is felmerül. Ez az útvonal inkább a vazodilatáció lefékezésében, illetve a CBF válaszreakció utolsó, oligémiás komponensének mediálásában tűnik érdekletesnek.^{139,342} A $PGF_{2\alpha}$ pontosabb szerepét jelenleg mi is vizsgáljuk.³⁶⁸ A vazokonstriktió egy másik útvonalának tekintettük a $[K^+]_e$ SD-vel összefüggő drasztikus emelkedését (i.e. > 20 mM). Munkánk során bizonyítást nyert, hogy az SD-vel járó magas $[K^+]_e$, mely eredményeink szerint meghatározó részben az asztrocita-végtalpak BK csatornáin keresztül áramlik a perivaszkuláris térbe, az agykérgi arteriolák direkt összehúzódását váltja ki (6.3. fejezet). A kutatás azt is igazolta, hogy a magas $[K^+]_e$ - által okozott vazokonstriktió részben a cerebrovaszkuláris simaizomsejtek L-típusú VGCC-in, az intracelluláris kalciumszint emelkedésén keresztül valósul meg (6.3. fejezet). Ezt támasztják alá legfrisseb eredményeink is, melyek szerint az L-típusú VGCC-k gátlása fokozza a CBF változás hiperémiás komponensét.³⁶⁷ A K^+ -alapú vaszkuláris csatolásban és a K^+ homeosztázis SD utáni rendezésében központi szerepet tölt be az asztrociták hálózata, hiszen a K^+ egyrészt BK csatornáikon keresztül ürülhet a perivaszkuláris térbe,^{140,206} másrészt Kir4.1 csatornáik révén valósul meg a K^+ pufferelése.^{193,205} A K^+ -alapú szabályozásra irányuló új kutatásainkban ezért az asztrocita hálózat dinamikus működését, az asztrociták közötti kommunikáció jellegét vizsgáljuk.

Elsősorban az SD során citotoxikus koncentrációban felhalmozódó K^+ és glutamát pufferelemével összefüggő mechanizmusokra koncentrálnak.

Az életkor fontos rizikófaktora azoknak a neurológiai kórképeknek, melyekben az SD kórélettani jelentőséggel bír, mégis hosszú évtizedekig elkerülték a figyelmet az SD életkorfüggő sajátosságai. Egy brazil kutatócsoport ugyan kitartóan tanulmányozza a kora életkor, a laktáció és a tápláltsági állapot hatását az SD terjedésére egészséges agyban,^{80,124,128,150,347} azonban az időskori elváltozásokat, vagy azok átfedését az iszkémiával nem vizsgálták. Munkánk ebből a szempontból a mai napig egyedülálló a tématerületen.^{126,175} Többszörösen bizonyítottuk, hogy az SD kiválthatósága fiatal felnőttkortól az időskorig fokozatosan csökken (7. fejezet). Ugyanakkor megállapítást nyert az is, hogy az idős sérült agyban kialakuló SD után a repolarizáció késik, az SD szövetkárosító hatása hangsúlyozottabbá válik (7.3. fejezet). Összességében az az álláspont fogalmazódott meg, hogy bár az idős agyban az SD kisebb valószínűséggel jelenik meg, mint a fiatalban, terjedése mégis nagyobb metabolikus terhet ró az idegszövetre, és az iszkémiás károsodást ezért az életkor előrehaladtával jelentősen elmélyíti.

A megállapítást alátámasztják az agyi keringésre vonatkozó megfigyeléseink is. Az SD-hez csatolt CBF változás hiperémiás komponense kisebb az idős agyban, ami a szabályozás hatékonyságának romlását feltételezi (8.3. ábra). Ugyanakkor a terjedő iszkémia kialakulásának esélye a kor előrehaladtával szembetűnően megnő (7.3. fejezet). Valószínűleg ez az oka annak is, hogy az idős agyban az iszkémiára válaszul működésbe lépő CBF kompenzáció nem kielégítő; az áramlás részleges javulása helyett további fokozatos áramlás-csökkenés tapasztalható. Eredményeink zömében az agykéreg egy adott pontjából elvezetett áramlási dinamikára hagyatkoztak, bár a teljeskép-analízis módszerével az agykérgi véráramlás területi eloszlásáról is nyertünk adatokat (5.2. és 7.3.2. fejezet). Jelenleg is dolgozunk a CBF területi eloszlásának életkorfüggő értékelésén LASCA módszerrel számított áramlási térképek felhasználásával. A 4.2. fejezetben bemutatott piális arteriolaátmérő-bebecslés módszerével arra is keressük a választ, hogy az agyi érreaktivitást miként befolyásolja az életkor. Végül abból a megalapozott feltételezésből kiindulva, hogy az idős agyban az agyi érhálózat megritkulása alapját képezheti az alacsonyabb perfúzióknak,¹²⁰ a patkány agykéreg 3D mikroCT rekonstrukciójával határozzuk meg az agykérgi érhálózat sűrűségét.



8.3. ábra. A terjedő depolarizációhoz (spreading depolarizatin, SD) csatolt hiperémia szabályozásának jellege az öregedéssel összefüggésben. Munkahipotézisünk szerint az SD-vel járó hiperémia szabályozásában központi szerepet töltenek be a vazoaktív metabolitok. A funkcionális és reaktív hiperémia közötti spektrumon az SD elképzelésünk szerint a reaktív hiperémiához áll közelebb, melyet valószínűsít az is, hogy a hiperémia a CBF változás első, hipoperfúziós komponensét követi. Feltételezzük, hogy az idős agyban az értónust szabályozó csatolás érzékenysége, hatékonysága gyengül.

Fiatal rágszálókon végzett kísérleteink eredményei alapján megfogalmaztuk a hipotézist, hogy az acidózis szövetkárosító hatása (5.4. fejezet), és hogy az acidózis a laktát felhalmozódása révén szabályozhatja az agykérgi arteriolák átmérőjét (6.2. fejezet). Az eredményekből kiindulva kíváncsiak voltunk arra, hogy az életkor miként módosítja az SD-vel járó acidózis mértékét és a CBF

változáshoz való viszonyát. Az acidózis maximuma ugyan nem tért el a fiatal agyban tapasztalható képestről, de az idős iszkémiás agyban a szöveti pH az SD-t követően nem tért vissza a kiindulási értékre. Az SD hullámfrontja mögött a fiziológiához képest kedvezőtlen, enyhén savas szöveti kémhatás maradt fenn (7.4 fejezet). Az acidózis időtartamát az idős agyban továbbá nem követte a hiperémia hossza, a két változó közötti összefüggés megbomlott (7.4 fejezet). A szöveti acidózis vizsgálatával gyűjtött tapasztalataink alapján született az elképzelés, hogy a szöveti pH csökkenését a sérült területre korlátozódó gyógyszerhatóanyag-bejuttatásra használjuk ki iszkémiás sérülések esetén. Jelenlegi kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy savas pH-ra nyíló, értágító nimodipint (6.3. fejezet) szállító nanopartikulumok milyen hatékonysággal adják le a hatóanyagot és ezen az úton elérhető-e védő hatás az agyi iszkémia állatmodelljében. A szöveti pH alapján, az iszkémiás szövetrégióra leszűkített kezelések révén elkerülhetőek lennének a hatóanyagok nem kívánatos, szisztémás mellékhatásai.

A tudományterület dinamikus fejlődése fokozatosan újabb lehetőségeket kínál az SD és a neurovaszkuláris csatolás kutatásában. Az altatott állatokban leírt agyi értónus-szabályozó mechanizmusok pontosabb megismerésében például egyre nagyobb teret nyer az éber, szabadon mozgó állatmodellek alkalmazása, hiszen az altatószerek a serkentő ingerületátvitel gyengítésével és a gátló transzmisszó támogatásával a neuronális aktivitást és a hemodinamikai válaszokat módosítják.³⁸⁹ Az altatószerek neuroprotektív hatása is szorgalmazza az éber modellek széleskörűbb elterjedését, mert számos altató, köztük a kísérleteink zömében használt izoflurán csökkenti az SD előfordulásának valószínűségét,^{202,211} a csatolt hiperémia mértékét,^{367,369} és magát az iszkémiás sérülést.^{321,409} Az SD előidézése szabadon mozgó, éber állatban új megoldások kidolgozását igényli, melyek közül elegáns megközelítés az SD optogenetikai kiváltása.^{64,185} Az új módszerek alkalmazásától azt remélhetjük, hogy a kísérletes eredmények nagyobb hatékonysággal és pontosabban transzlálhatók a neurológiai kórfolyamatok megértéséhez.

Az orvos-biológiai kutatások sarkalatos pontja a transzlációs potenciál. Ez igaz a különböző emlősökön, első sorban rágcsálókön végzett SD vizsgálatok esetén is. Azóta, hogy direkt bizonyítást nyert az SD előfordulása akut agysérülést elszenvedett betegek agykérgében,^{252,359} egyre nagyobb figyelmet kap a jelenség szerepének tisztázása a másodlagos sérülések kialakulásában.^{96,164} A kórfolyamatok megismerésére építve elérhető céllá vált az SD kialakulásának gátlása és a csatolt hemodinamikai válasz kedvező irányú befolyásolása.³²⁵ Bemutatott és folyamatban lévő kutatásaink ezekbe az irányokba tettek, tesznek lényeges előrelépéseket.

Hetvenöt évvel az SD felfedezése után²²⁷ egy neurológusokból, idegsebészekből és kísérletes kutatókból álló, elhivatott nemzetközi csoport (Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations, COSBID; www.cosbid.org), amelynek mi is aktív részesei lettünk, meghatározó előrelépést tett az SD jelentőségének felismerésében. Az elmúlt tizenöt év során közös erőfeszítéssel megalkották és optimalizálták azokat a módszereket, melyekkel az SD események a betegek agykérgéből elvezethetők és számszerűen jellemezhetők.^{104,122,165,167,359} Leírták, hogy a koponyaműtétet követő napokban és hetekben az SD rendszeresen kialakul a SAH-ban, a TBI-ben és a súlyos iszkémiás stroke-ban szenvedő betegekben.^{108,167,415} Megállapították, hogy az SD ismétlődő előfordulása az elsődleges sérülés rosszabb kimenetelét vetíti előre.^{96,108,176} Felismerték, hogy az SD meghatározott körülmények között agyi vazokonstriktiót, áramlásesést vált ki (5.3. fejezet).^{101,176,415} Igazolták, hogy az SD progresszív, metabolikus okokra visszavezethető funkcionális károsodást okoz¹⁰⁸ (5. fejezet). Megfigyelték, hogy az SD lefutása farmakológia úton modulálható, így az SD gátlása neuroprotektív terápiák célpontjaként jelölhető meg (6.3. fejezet).^{40,100,306,307,322,323,324,367,413} Végül felvetették annak a lehetőségét, hogy az SD monitorozását diagnosztikai eszközként használják az idegsebészeti intenzív osztályokon.^{96,98}

Meghatározó felfedezéseik kétséget kizáróan tanúsítják az SD kutatásának létjogosultságát, és termékeny táptalajt biztosítanak a további transzlációs kutatómunkának.

9. Új megállapítások

- 9.1. Kísérletes bizonyítékokat szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy agyi iszkémia során az SD-hez káros CBF reakció társul, és a súlyosbodik a szöveti acidózis mértéke is, amelyek együttesen felelősek lehetnek az SD szövetkárosító hatásáért. Több kísérleti modellben igazoltuk az SD-hez társuló terjedő iszkémia jelenségét. Kimutattuk, hogy a kritikusan alacsony szöveti perfúzió kedvező feltételeket teremt a terjedő iszkémia kialakulásához, amely során tovább csökken az agykéreg vérellátása. Mindezek alapján a terjedő iszkémia lényeges szerepet tölthet be az előagyi iszkémiával kapcsolatos neurodegeneratív kórfolyamatokban.
- 9.2. Lényeges megállapításokat tettünk annak igazolására, hogy az SD és az AD egyazon ideglettani jelenség időbeli lefutásában eltérő kifejeződése. Bizonyítottuk, hogy a terminális AD – az SD-hez hasonlóan – terjedő jelenség, mivel terjedési sebességeik megegyeznek. Eredményeink megalapozták azt a nézetet, mely szerint a külön jelenségekként számon tartott AD, peri-infarktusz depolarizáció, iszkémiás depolarizáció valamint SD ugyanazon ideglettani folyamat manifesztációja egy jól meghatározható spektrum mentén. Bemutattuk, hogy az SD/AD szerepet játszik a globális előagyi iszkémiás sérülések kóreltani folyamataiban. Eredményeink hiánypótlóak, hiszen kutatásainkat megelőzően a „spontán” kialakuló SD-eket csak iszkémiás vagy traumás agysérülések fokális léziói kapcsán ismerték.
- 9.3. Több eredeti megfigyelést tettünk az SD-vel összefüggő CBF változások szabályozására vonatkozóan. Bizonyítottuk, hogy ép agykéregben az SD-t követő hiperémia kialakulásában fontos szerepe van a vazodilatátor PGE_2/EP_4 útvonalnak. Kimutattuk, hogy iszkémiás körülmények között ez a szignalizáció károsodik. Megmutattuk, hogy ép agykéregben az SD-hez társuló korai érösszehúzó hatás az extracelluláris K^+ felhalmozódásának következménye. Feltártuk a BK csatornák meghatározó szerepét az érösszehúzó hatás kialakításában, illetve bizonyítottuk az L-típusú VGCC-k részvételét is. További bizonyítékokat szolgáltatunk arra vonatkozóan is, hogy ép agyszövetben az SD-hez kapcsolódó CBF változás mediátorai meghatározó mértékben tartalmaznak metabolikus komponenseket.
- 9.4. Feltártuk, hogy az életkor előrehaladtával csökken az SD kiválthatósága, ellenben súlyosbodik az SD-hez köthető metabolikus krízis. Rávilágítottunk arra, hogy az idős agyban az SD erőteljesebb szövetkárosító hatása mögött SD-hez társuló CBF változás elégtelensége állhat, hiszen az idős agyban jelentősen megnő a terjedő iszkémia kialakulásának valószínűsége. Végül rámutattunk arra, hogy az idős agyban SD-t követően késleltetett a szöveti pH helyreállása az SD-t megelőző korábbi fiziológiai értékre.
- 9.5. Kutatási céljaink szolgálatában létrehoztunk egy egyedi, multi-modális, optikai elven működő, képalkotó rendszert, amelyet az elmúlt évek során kísérleti céljaink érdekében sokrétűen fejlesztettünk. Módszereink alkalmasak az agykérgi mezőpotenciál, a pH, a K^+ koncentráció a vérátáramlás, a térfogat és a hemoglobin szaturáció változásainak képi megjelenítésére. A megfelelő időbeni felbontással készített és tárolt képekből pontos idősor és korrelációs analízis végezhető a megfigyelt agykérgi terület tesztelt pontjain.

10. Etikai engedélyek

A kísérleteket a Brit Belügyminisztérium érvényes, állatkísérletekre vonatkozó rendelkezései szerint hajtottuk végre (British Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986), illetve a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága és a Csongrád Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi és Élelmiszerlánc-biztonsági Főosztálya hagyta jóvá, a Magyar Tudományos Akadémia Állatkísérleti Tudományos Bizottsága állásfoglalásával, az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelettel, és a 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel összhangban.

11. Támogatók

Az értekezésben elvégzett kutatásokat támogatta a Szegedi Tudományegyetem; a Magyar Tudományos Akadémia, a Wellcome Trust (Egyesült Királyság); az Országos Tudományos és Kutatási Alap és az EGT Norvég Finanszírozási Mechanizmusok; a Nemzeti Agykutatási Program, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal; a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program; az Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program; és a L'OREAL–UNESCO a Nőkért és a Tudományért program.

12. Irodalomjegyzék

1. Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J Neuroimmunol.* 2007;184(1-2):172-9.
2. Aitken PG, Jing J, Young J, Somjen GG. Ion channel involvement in hypoxia-induced spreading depression in hippocampal slices. *Brain Res.* 1991;541(1):7-11.
3. Aitken PG, Tombaugh GC, Turner DA, Somjen GG. Similar propagation of SD and hypoxic SD-like depolarization in rat hippocampus recorded optically and electrically. *J Neurophysiol.* 1998;80(3):1514-21.
4. Akram A, Gibson CL, Grubb BD. Neuroprotection mediated by the EP₄ receptor avoids the detrimental side effects of COX-2 inhibitors following ischaemic injury. *Neuropharmacology.* 2013;65:165-72.
5. Alborch E, Salom JB, Torregrosa G. Calcium channels in cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 1995;68(1):1-34.
6. Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Boone SC, Chou SN, Kelly DL, Weir BK, Crabbe RA, Lavik PJ, Rosenbloom SB, Dorsey FC, Ingram CR, Mellits DE, Bertsch LA, Boisvert DP, Hundley MB, Johnson RK, Strom JA, Transou CR. Cerebral arterial spasm--a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med.* 1983;308(11):619-24.
7. Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W. Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. *Anal Chem.* 1981;53(14):2267-9.
8. Andreasson K. Emerging roles of PGE₂ receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010;91(3-4):104-12.
9. Astrup J, Rehncrona S, Siesjö BK. The increase in extracellular potassium concentration in the ischemic brain in relation to the preischemic functional activity and cerebral metabolic rate. *Brain Res.* 1980;199(1):161-74.
10. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 1977;8(1):51-7.
11. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468(7321):232-43.
12. Ay H, Koroshetz WJ, Vangel M, Benner T, Melinosky C, Zhu M, Menezes N, Lopez CJ, Sorensen AG. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke.* 2005;36(12):2632-6.
13. Ayata C. Monitoring anoxic depolarization at the bedside: A step closer to the 24th century. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Jul;38(7):1123-1124.
14. Ayata C. Spreading depression and neurovascular coupling. *Stroke.* 2013;44(6 Suppl 1):S87-9.
15. Ayata C, Dunn AK, Gursoy-OZdemir Y, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(7):744-55.
16. Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev.* 2015;95(3):953-93.
17. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH, Noebels JL, Moskowitz MA. Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the alpha1A subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience.* 2000;95(3):639-45.
18. Ba AM, Guiou M, Pouratian N, Muthialu A, Rex DE, Cannestra AF, Chen JW, Toga AW. Multiwavelength optical intrinsic signal imaging of cortical spreading depression. *J Neurophysiol.* 2002;88(5):2726-35.
19. Back T, Hoehn M, Mies G, Busch E, Schmitz B, Kohno K, Hossmann KA. Penumbra tissue alkalosis in focal cerebral ischemia: relationship to energy metabolism, blood flow, and steady potential. *Ann Neurol.* 2000;47(4):485-92.
20. Back T, Kohno K, Hossmann KA. 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.* 1994;14(1):12-19.
21. Balestrino M, Young J, Aitken P. Block of (Na⁺,K⁺)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res.* 1999;838(1-2):37-44.
22. Barbosa P, Peters TM. The effects of vital dyes on living organisms with special reference to methylene blue and neutral red. *Histochem J.* 1971;3(1):71-93.
23. Bari F, Errico RA, Louis TM, Busija DW. Interaction between ATP-sensitive K⁺ channels and nitric oxide on pial arterioles in piglets. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1158-64.
24. Bari F, Louis TM, Meng W, Busija DW. Global ischemia impairs ATP-sensitive K⁺ channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke.* 1996;27(10):1874-80; discussion 1880-1.
25. Bazzigaluppi P, Dufour S, Carlen PL. Wide field fluorescent imaging of extracellular spatiotemporal potassium dynamics in vivo. *Neuroimage.* 2015;104:110-6.

26. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 1984;43(5):1369-74.
27. Benzi G, Gorini A, Arnaboldi R, Ghigini B, Villa RF. Age-related alterations by chronic intermittent hypoxia on cerebral synaptosomal ATPase activities. *J Neural Transm Suppl.* 1994;44:159-171.
28. Betz E. The significance of cortical extracellular pH for the regulation of blood flow in the cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 1968;30:99-102.
29. Bosche B, Graf R, Ernestus RI, Dohmen C, Reithmeier T, Brinker G, Strong AJ, Dreier JP, Woitzik J; Members of the Cooperative Study of Brain Injury Depolarizations (COSBID). Recurrent spreading depolarizations after subarachnoid hemorrhage decreases oxygen availability in human cerebral cortex. *Ann Neurol.* 2010;67(5):607-17.
30. Brennan KC, Beltrán-Parrazal L, López-Valdés HE, Theriot J, Toga AW, Charles AC. Distinct vascular conduction with cortical spreading depression. *J Neurophysiol.* 2007;97(6):4143-51.
31. Briers JD. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas.* 2001;22(4):R35-66.
32. Briers D, Duncan DD, Hirst E, Kirkpatrick SJ, Larsson M, Steenbergen W, Stromberg T, Thompson OB. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations. *J Biomed Opt.* 2013;18(6):066018.
33. Bruns J Jr, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia.* 2003;44(s10):2-10.
34. Bures J. The ontogenetic development of steady potential differences in the cerebral cortex in animals. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1957;9(1):121-30.
35. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1090-9.
36. Busija DW, Thore C, Beasley T, Bari F. Induction of cyclooxygenase-2 following anoxic stress in piglet cerebral arteries. *Microcirculation.* 1996;3(4):379-86.
37. Butcher SP, Bullock R, Graham DI, McCulloch J. Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1990;21(12):1727-33.
38. Cain SM, Bohnet B, LeDue J, Yung AC, Garcia E, Tyson JR, Alles SR, Han H, van den Maagdenberg AM, Kozłowski P, MacVicar BA, Snutch TP. In vivo imaging reveals that pregabalin inhibits cortical spreading depression and propagation to subcortical brain structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(9):2401-2406.
39. Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martínez G, León OS, Springer JE. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2003;86(3):545-555.
40. Carlson AP, Abbas M, Alunday RL, Qeadan F, Shuttleworth CW. Spreading depolarization in acute brain injury inhibited by ketamine: a prospective, randomized, multiple crossover trial. *J Neurosurg.* 2018;1:1-7.
41. Caro A, Tarabova B, Rojo-Ruiz J, Lacinova L. Nimodipine inhibits AP firing in cultured hippocampal neurons predominantly due to block of voltage-dependent potassium channels. *Gen Physiol Biophys.* 2011;30 Spec No:S44-S53.
42. Cauli B, Hamel E. Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics.* 2010;2:9.
43. Cervetto C, Alloisio S, Frattaroli D, Mazzotta MC, Milanese M, Gavazzo P, Passalacqua M, Nobile M, Maura G, Marcoli M. The P2X7 receptor as a route for non-exocytotic glutamate release: dependence on the carboxyl tail. *J Neurochem.* 2013;124(6):821-31.
44. Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarti S. Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol.* 2003;38(6):705-710.
45. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2016;15(8):869-881.
46. Chao FC, Tullis JL, Conneely GS, Lawler JW. Aggregation of platelets and inert particles induced by thrombin. *Thromb Haemost.* 1976;35(3):717-736.
47. Charpentier C, Audibert G, Guillemin F, Civit T, Ducrocq X, Bracard S, Hepner H, Picard L, Laxenaire MC. Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1999;30(7):1402-8.
48. Chemla S, Chavane F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. *J Physiol Paris.* 2010 Jan;104(1-2):40-50.
49. Chen G, Gao W, Reinert KC, Popa LS, Hendrix CM, Ross ME, Ebner TJ. Involvement of kv1 potassium channels in spreading acidification and depression in the cerebellar cortex. *J Neurophysiol.* 2005;94(2):1287-98.

50. Chen G, Hanson CL, Ebner TJ. Optical responses evoked by cerebellar surface stimulation in vivo using neutral red. *Neuroscience*. 1998;84(3):645-68.
51. Chen RL, Balami JS, Esiri MM, Chen LK, Buchan AM. Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(5):256-65.
52. Chen S, Feng Z, Li P, Jacques SL, Zeng S, Luo Q. In vivo optical reflectance imaging of spreading depression waves in rat brain with and without focal cerebral ischemia. *J Biomed Opt*. 2006;11(3):34002.
53. Chen S, Li P, Luo W, Gong H, Zeng S, Luo Q. Time-varying spreading depression waves in rat cortex revealed by optical intrinsic signal imaging. *Neurosci Lett*. 2006;396(2):132-6.
54. Chen S, Li P, Luo W, Gong H, Zeng S, Luo Q. Origin sites of spontaneous cortical spreading depression migrated during focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2006;403(3):266-70.
55. Chen Y, Geisler WS, Seidemann E. Optimal decoding of correlated neural population responses in the primate visual cortex. *Nat Neurosci*. 2006;9(11):1412-20.
56. Cheng H, Duong TQ. Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging. *Opt Lett*. 2007;32(15):2188-90.
57. Cheng H, Luo Q, Zeng S, Chen S, Cen J, Gong H. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution. *J Biomed Opt*. 2003;8(3):559-64.
58. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1183-221.
59. Chesler M, Kaila K. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci*. 1992;15(10):396-402.
60. Chesler M, Kraig RP. Intracellular pH of astrocytes increases rapidly with cortical stimulation. *Am J Physiol*. 1987;253(4 Pt 2):R666-70.
61. Chesselet MF, Gonzales C, Lin CS, Polsky K, Jin BK. Ischemic damage in the striatum of adult gerbils: relative sparing of somatostatinergic and cholinergic interneurons contrasts with loss of efferent neurons. *Exp Neurol*. 1990;110(2):209-18.
62. Cholet N, Pellerin L, Magistretti PJ, Hamel E. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex*. 2002;12(5):515-25.
63. Choy M, Ganesan V, Thomas DL, Thornton JS, Proctor E, King MD, van der Weerd L, Gadian DG, Lythgoe MF. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(8):1066-75.
64. Chung DY, Sadeghian H, Qin T, Lule S, Lee H, Karakaya F, Goins S, Oka F, Yaseen MA, Houben T, Tolner EA, van den Maagdenberg AMJM, Whalen MJ, Sakadžić S, Ayata C. Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb Cortex*. 2018 Feb 7. doi: 10.1093/cercor/bhy021.
65. Cippola MJ. *The cerebral circulation*. Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael, CA, 2009.
66. Clark D, Tuor UI, Thompson R, Institoris A, Kulynych A, Zhang X, Kinniburgh DW, Bari F, Busija DW, Barber PA. Protection against recurrent stroke with resveratrol: endothelial protection. *PLoS One*. 2012;7(10):e47792.
67. Costa C, Tozzi A, Rainero I, Cupini LM, Calabresi P, Ayata C, Sarchielli P. Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain*. 2013;14:62.
68. Cohadon F, Desbordes P. Brain water and aging. *Gerontology*. 1986;32 Suppl 1:46-49.
69. Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL. BK Channels in the Central Nervous System. *Int Rev Neurobiol*. 2016;128:281-342.
70. Crobbeddu E, Mittal MK, Dupont S, Wijidicks EF, Lanzino G, Rabinstein AA. Predicting the lack of development of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2012;43(3):697-701.
71. Csiba L, Paschen W, Mies G. Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain. *Brain Res*. 1985;336(1):167-70.
72. Czéh G, Aitken PG, Somjen GG. hole-cell membrane current and membrane resistance during hypoxic spreading depression. *Neuroreport*. 1992;3(2):197-200.
73. Czéh G, Aitken PG, Somjen GG. Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization. *Brain Res*. 1993;632(1-2):195-208.
74. D'Arceuil HE, de Crespigny A. Dynamic Diffusion Magnetic Resonance Imaging of Infarct Formation and Peri-infarct Spreading Depression after Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) in macaca fascicularis. *Open Neuroimag J*. 2011;5:153-9.
75. Dahlem YA, Hanke W. Intrinsic optical signal of retinal spreading depression: second phase depends on energy metabolism and nitric oxide. *Brain Res*. 2005;1049(1):15-24.
76. Dahlem MA, Müller SC. Image processing techniques applied to excitation waves in the chicken retina. *Methods*. 2000;21(4):317-23.

77. Dahlem MA, Müller SC. Self-induced splitting of spiral-shaped spreading depression waves in chicken retina. *Exp Brain Res.* 1997;115(2):319-24.
78. Davies ML, Kirov SA, Andrew RD. Whole isolated neocortical and hippocampal preparations and their use in imaging studies. *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):203-16.
79. Davis RJ, Murdoch CE, Ali M, Purbrick S, Ravid R, Baxter GS, Tilford N, Sheldrick RL, Clark KL, Coleman RA. EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 2004;141(4):580-5.
80. de Aguiar MJ, de Aguiar CR, Guedes RC. Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats. *Nutr Neurosci.* 2011;14(4):159-64.
81. de Castro MT, de Castro JC, Menani JV. The effects of forebrain multiple lesions on the pressor response induced by bilateral carotid occlusion in conscious rats. *Brain Res.* 1993;612(1-2):243-6.
82. de Crespigny AJ, Röther J, Beaulieu C, Moseley ME, Hoehn M. Rapid monitoring of diffusion, DC potential, and blood oxygenation changes during global ischemia. Effects of hypoglycemia, hyperglycemia, and TTX. *Stroke.* 1999;30(10):2212-22.
83. de Lores Arnaiz GR, Ordieres MG. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci.* 2014;10(2):85-102.
84. de Oliveira Castro G, Martins-Ferreira H, Gardino PF. Dual nature of the peaks of light scattered during spreading depression in chick retina. *An Acad Bras Cienc.* 1985;57(1):95-103.
85. de Rooij NK, Greving JP, Rinkel GJ, Frijns CJ. Early prediction of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: development and validation of a practical risk chart. *Stroke.* 2013;44(5):1288-94.
86. DeFazio RA, Hablitz JJ. Horizontal spread of activity in neocortical inhibitory networks. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005;157(1):83-92.
87. Di Cesare Mannelli L, Marcoli M, Micheli L, Zanardelli M, Maura G, Ghelardini C, Cervetto C. Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin 1. *Neuropharmacology.* 2015;97:133-41.
88. Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR. Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience.* 2013;251:21-32.
89. Dijkhuizen RM, Beekwilder JP, van der Worp HB, Berkelbach van der Sprenkel JW, Tulleken KA, Nicolay K. Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain. *Brain Res.* 1999;840(1-2):194-205.
90. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(12):1465-1478.
91. Dirnagl U. Thomas Willis Lecture: Is Translational Stroke Research Broken, and if So, How Can We Fix It? *Stroke.* 2016;47(8):2148-2153.
92. Domoki F, Veltkamp R, Thrikawala N, Robins G, Bari F, Louis TM, Busija DW. Ischemia-reperfusion rapidly increases COX-2 expression in piglet cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1999;277(3):H1207-14.
93. Domoki F, Perciaccante JV, Shimizu K, Puskar M, Busija DW, Bari F. N-methyl-D-aspartate-induced vasodilation is mediated by endothelium-independent nitric oxide release in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(4):H1404-9.
94. Domoki F, Zölei D, Oláh O, Tóth-Szuki V, Hopp B, Bari F, Smausz T. Evaluation of laser-speckle contrast image analysis techniques in the cortical microcirculation of piglets. *Microvasc Res.* 2012;83(3):311-7.
95. Dora E, Tanaka K, Greenberg JH, Gonatas NH, Reivich M. Kinetics of microcirculatory, NAD/NADH, and electrocorticographic changes in cat brain cortex during ischemia and recirculation. *Ann Neurol.* 1986 Jun;19(6):536-44.
96. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med.* 2011;17(4):439-47.
97. Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhüpl KM, Victorov I, Dirnagl U. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg.* 2000;93(4):658-66.
98. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, William Shuttleworth C, Dohmen C, Graf R, Vajkoczy P, Helbok R, Suzuki M, Schiefecker AJ, Major S, Winkler MK, Kang EJ, Milakara D, Oliveira-Ferreira AI, Reiffurth C, Revankar GS, Sugimoto K, Dengler NF, Hecht N, Foreman B, Feyen B, Kondziella D, Friberg CK, Piilgaard H, Rosenthal ES, Westover MB, Maslarova A, Santos E, Hertle D, Sánchez-Porrás R, Jewell SL, Balança B, Platz J, Hinzman JM, Lückl J, Schoknecht K, Schöll M, Drenckhahn C, Feuerstein D, Eriksen N, Horst V, Bretz JS, Jahnke P, Scheel M, Bohner G, Rostrup E, Pakkenberg B, Heinemann U, Claassen J, Carlson AP, Kowoll CM, Lublinsky S, Chassidim Y, Shelef I, Friedman A, Brinker G, Reiner M, Kirov SA, Andrew RD, Farkas E, Güresir E, Vatter H, Chung LS, Brennan KC,

- Lieutaud T, Marinesco S, Maas AI, Sahuquillo J, Dahlem MA, Richter F, Herreras O, Boutelle MG, Okonkwo DO, Bullock MR, Witte OW, Martus P, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Dijkhuizen RM, Shutter LA, Andaluz N, Schulte AP, MacVicar B, Watanabe T, Woitzik J, Lauritzen M, Strong AJ, Hartings JA. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1595-1625.
99. Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U. Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain.* 2002;125(Pt 1):102-12.
 100. Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhüpl KM, Dirnagl U. Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats. *Neurosurgery.* 2002;51(6):1457-65; discussion 1465-7.
 101. Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(9):978-90.
 102. Dreier JP, Lemale CL, Kola V, Friedman A, Schoknecht K. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacology.* 2018;134(Pt B):189-207.
 103. Dreier JP, Major S, Foreman B, Winkler MKL, Kang EJ, Milakara D, Lemale CL, DiNapoli V, Hinzman JM, Woitzik J, Andaluz N, Carlson A, Hartings JA. Terminal spreading depolarization and electrical silence in death of human cerebral cortex. *Ann Neurol.* 2018;83(2):295-310.
 104. Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolias C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Bohner G, Strong AJ; COSBID study group. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain.* 2009;132(Pt 7):1866-81.
 105. Dreier JP, Major S, Pannek HW, Woitzik J, Scheel M, Wiesenthal D, Martus P, Winkler MK, Hartings JA, Fabricius M, Speckmann EJ, Gorji A; COSBID study group. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain.* 2012;135(Pt 1):259-75.
 106. Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol.* 2001;531(Pt 2):515-26.
 107. Dreier JP, Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron.* 2015;86(4):902-922.
 108. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain.* 2006;129(Pt 12):3224-37.
 109. Drenckhahn C, Winkler MK, Major S, Scheel M, Kang EJ, Pinczolics A, Grozea C, Hartings JA, Woitzik J, Dreier JP; COSBID study group. Correlates of spreading depolarization in human scalp electroencephalography. *Brain.* 2012;135(Pt 3):853-68.
 110. Drewes LR, Gilboe DD. Glycolysis and the permeation of glucose and lactate in the isolated, perfused dog brain during anoxia and postanoxic recovery. *J Biol Chem.* 1973;248(7):2489-96.
 111. Dugan LL and Choi DW. Hypoxia-ischemia and brain infarction. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p. 711-30.
 112. Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(3):195-201.
 113. Dunn AK, Devor A, Bolay H, Andermann ML, Moskowitz MA, Dale AM, Boas DA. Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation. *Opt Lett.* 2003;28(1):28-30.
 114. Dunn AK, Devor A, Dale AM, Boas DA. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage.* 2005;27(2):279-90.
 115. Ebner TJ, Chen G. Spreading acidification and depression in the cerebellar cortex. *Neuroscientist.* 2003;9(1):37-45.
 116. Eklöf B, MacMillan V, Siesjö BK. Cerebral energy state and cerebral venous PO₂ in experimental hypotension caused by bleeding. *Acta Physiol Scand.* 1972;86(4):515-27.
 117. Elmer J, Callaway CW. The Brain after Cardiac Arrest. *Semin Neurol.* 2017;37(1):19-24.
 118. Eriksen N, Rostrup E, Fabricius M, Scheel M, Major S, Winkler MKL, Bohner G, Santos E, Sakowitz OW, Kola V, Reiffurth C, Hartings JA, Vajkoczy P, Woitzik J, Martus P, Lauritzen M, Pakkenberg B, Dreier JP. Early focal brain injury after subarachnoid hemorrhage correlates with spreading depolarizations. *Neurology.* 2019;92(4):e326-e341. doi: 10.1212/WNL.0000000000006814.

119. Espinosa F, Weir B, Overton T, Castor W, Grace M, Boisvert D. A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys. Part 1: Clinical and radiological findings. *J Neurosurg.* 1984;60(6):1167-75.
- Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist.* 2003;9(3):181-94.
120. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, Epstein SE. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1748-56.
121. Fabricius M, Akgoren N, Lauritzen M. Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 2):H23-9.
122. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain.* 2006;129(Pt 3):778-90.
123. Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(9):1973-84.
124. Farias-Santos Rde C, Lira MC, Pereira DE, de Sá IR, Pimentel MR, Araújo LL, Guedes RC. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. *Neurosci Lett.* 2009;454(3):218-22.
125. Faris IB, Jamieson GG, Ludbrook J. Effects of acute changes in blood volume on the carotid sinus baroreceptor reflex in conscious rabbits. *J Physiol.* 1983;337:563-73.
126. Farkas E, Bari F. Spreading depolarization in the ischemic brain: does aging have an impact? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Nov;69(11):1363-70.
127. Farkas E, Luiten PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;64(6):575-611.
128. Frazão MF, Silva de Seixas Maia LM, Guedes RC. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. *Neurosci Lett.* 2008;447(1):26-30.
129. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res.* 2017 Feb 3;120(3):439-448.
130. Ferezou I, Bolea S, Petersen CC. Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron.* 2006;50(4):617-29.
131. Fernandes de Lima VM, Hanke W. Modulation of CNS excitability by water movement. The D₂O effects on the non-linear neuron-glia dynamics. *J Biophys Chem.* 2011; 2(3):353-60.
132. Feuerstein D, Backes H, Gramer M, Takagaki M, Gabel P, Kumagai T, Graf R. Regulation of cerebral metabolism during cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(11):1965-1977.
133. Feuerstein D, Takagaki M, Gramer M, Manning A, Endepols H, Vollmar S, Yoshimine T, Strong AJ, Graf R, Backes H. Detecting tissue deterioration after brain injury: regional blood flow level versus capacity to raise blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(7):1117-27.
134. Fordsmann JC, Ko RW, Choi HB, Thomsen K, Witgen BM, Mathiesen C, Lønstrup M, Piilgaard H, MacVicar BA, Lauritzen M. Increased 20-HETE synthesis explains reduced cerebral blood flow but not impaired neurovascular coupling after cortical spreading depression in rat cerebral cortex. *J Neurosci.* 2013 Feb 6;33(6):2562-70.
135. Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke.* 1993;24(12):2087-92; discussion 2092-3.
136. Fox PT, Raichle ME. Stimulus rate determines regional brain blood flow in striate cortex. *Ann Neurol.* 1985;17(3):303-5.
137. Fujita H, Matsuura T, Yamada K, Inagaki N, Kanno I. A sealed cranial window system for simultaneous recording of blood flow, and electrical and optical signals in the rat barrel cortex. *J Neurosci Methods.* 2000;99(1-2):71-8.
138. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke.* 1984;15(1):5-14.
139. Garipey H, Zhao J, Levy D. Differential contribution of COX-1 and COX-2 derived prostanoids to cortical spreading depression-Evoked cerebral oligemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(3):1060-1068.
140. Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3811-6.
141. Glaser EM, Van der Loos H. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods.* 1981;4(2):117-25.
142. Gold L, Back T, Arnold G, Dreier J, Einhüpl KM, Reuter U, Dirnagl U. Cortical spreading depression-associated hyperemia in rats: involvement of serotonin. *Brain Res.* 1998;783(2):188-93.
143. Gonçalves JT, Bloyd CW, Shtrahman M, Johnston ST, Schafer ST, Parylak SL, Tran T, Chang T, Gage FH. In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. *Nat Neurosci.* 2016;19(6):788-91.

144. Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*. 2008;456(7223):745-9.
145. Gourley JK, Heistad DD. Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol*. 1984;246(1 Pt 2):H52-8.
146. Grafstein, B. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*. 1956;19(2):154-71.
147. Greer DM. Mechanisms of injury in hypoxic-ischemic encephalopathy: implications to therapy. *Semin Neurol*. 2006;26(4):373-9.
148. Grinvald A, Hildesheim R. VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):874-85.
149. Grinvald A, Hildesheim R, Farber IC, Anglister L. Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophys J*. 1982;39(3):301-8.
150. Guedes RC, Amorim LF, Teodósio NR. Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(10):1407-12.
151. Hajek I, Subbarao KV, Hertz L. Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int*. 1996;28(3):335-42.
152. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014;508(7494):55-60.
153. Hansen AJ. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta Physiol Scand*. 1977;99(4):412-20.
154. Hansen AJ. The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol Scand*. 1978;102(3):324-9.
155. Hansen AJ. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev*. 1985;65(1):101-48.
156. Hansen AJ, Olsen CE. Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand*. 1980;108(4):355-65.
157. Hansen AJ, Quistorff B, Gjedde A. Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular K⁺ during spreading depression. *Acta Physiol Scand*. 1980;109(1):1-6.
158. Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand*. 1981;113(4):437-45.
159. Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front Neurosci*. 2016;9:499.
160. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(10):682-96.
161. Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 1992;12(7):2685-705.
162. Harrison-Felix C, Kolakowsky-Hayner SA, Hammond FM, Wang R, Englander J, Dams-O'Connor K, Kreider SE, Novack TA, Diaz-Arrastia R. Mortality after surviving traumatic brain injury: risks based on age groups. *J Head Trauma Rehabil*. 2012;27(6):E45-56.
163. Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, Tortella FC. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci*. 2003;23(37):11602-10.
164. Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, Ayata C, Hinzman JM, Foreman B, Andrew RD, Boutelle MG, Brennan KC, Carlson AP, Dahlem MA, Drenckhahn C, Dohmen C, Fabricius M, Farkas E, Feuerstein D, Graf R, Helbok R, Lauritzen M, Major S, Oliveira-Ferreira AI, Richter F, Rosenthal ES, Sakowitz OW, Sánchez-Porrás R, Santos E, Schöll M, Strong AJ, Urbach A, Westover MB, Winkler MK, Witte OW, Woitzik J, Dreier JP. The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(5):1571-1594.
165. Hartings JA, Strong AJ, Fabricius M, Manning A, Bhatia R, Dreier JP, Mazzeo AT, Tortella FC, Bullock MR; Co-Operative Study of Brain Injury Depolarizations. Spreading depolarizations and late secondary insults after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2009;26(11):1857-66.
166. Hartings JA, Videgon S, Strong AJ, Zacko C, Vagal A, Andaluz N, Ridder T, Stanger R, Fabricius M, Mathern B, Pahl C, Toliás CM, Bullock MR; Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations. Surgical management of traumatic brain injury: a comparative-effectiveness study of 2 centers. *J Neurosurg*. 2014;120(2):434-46.
167. Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J, Dreier JP, Puccio A, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ; Co-Operative Study on Brain Injury Depolarizations. Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain*. 2011;134(Pt 5):1529-40.

168. Hartings JA, Williams AJ, Tortella FC. Occurrence of nonconvulsive seizures, periodic epileptiform discharges, and intermittent rhythmic delta activity in rat focal ischemia. *Exp Neurol.* 2003;179(2):139-49.
169. Hashimoto M, Takeda Y, Sato T, Kawahara H, Nagano O, Hirakawa M. Dynamic changes of NADH fluorescence images and NADH content during spreading depression in the cerebral cortex of gerbils. *Brain Res.* 2000;872(1-2):294-300.
170. Heiss WD. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1268:26-34.
171. Hekmatpanah J. Cerebral blood flow dynamics in hypotension and cardiac arrest. *Neurology.* 1973;23(2):174-80.
172. Hepp S, Gerich FJ, Müller M. Sulfhydryl oxidation reduces hippocampal susceptibility to hypoxia-induced spreading depression by activating BK channels. *J Neurophysiol.* 2005;94(2):1091-103.
173. Hernández-Cáceres J, Macías-González R, Brozek G, Bures J. Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res.* 1987;437(2):360-4.
174. Herreras O, Somjen GG. Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population. *Brain Res.* 1993;610(2):276-82.
175. Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, Farkas E. Susceptibility of the cerebral cortex to spreading depolarization in neurological disease states: The impact of aging. *Neurochem Int.* 2018 Oct 15. pii: S0197-0186(18)30467-4.
176. Hinzman JM, Andaluz N, Shutter LA, Okonkwo DO, Pahl C, Strong AJ, Dreier JP, Hartings JA. Inverse neurovascular coupling to cortical spreading depolarizations in severe brain trauma. *Brain.* 2014;137(Pt 11):2960-72.
177. Hinzman JM, DiNapoli VA, Mahoney EJ, Gerhardt GA, Hartings JA. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp Neurol.* 2015;267:243-53.
178. Hoffmann U, Ayata C. Neurovascular coupling during spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;115:161-5.
179. Hoffmann U, Sukhotinsky I, Eikermann-Haerter K, Ayata C. Glucose modulation of spreading depression susceptibility. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(2):191-5.
180. Hood R, Budd A, Sorond FA, Hogue CW. Peri-operative neurological complications. *Anaesthesia.* 2018;73 Suppl 1:67-75.
181. Hopwood SE, Parkin MC, Bezzina EL, Boutelle MG, Strong AJ. Transient changes in cortical glucose and lactate levels associated with peri-infarct depolarisations, studied with rapid-sampling microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(3):391-401.
182. Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Dacey RG Jr. Mechanism of extracellular K⁺-induced local and conducted responses in cerebral penetrating arterioles. *Stroke.* 2002;33(11):2692-9.
183. Horrigan FT, Aldrich RW. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol.* 2002;120(3):267-305. Erratum in: *J Gen Physiol.* 2002;120(4):599.
184. Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1996;8(3):195-208.
185. Houben T, Loonen IC, Baca SM, Schenke M, Meijer JH, Ferrari MD, Terwindt GM, Voskuyl RA, Charles A, van den Maagdenberg AM, Tolner EA. Optogenetic induction of cortical spreading depression in anesthetized and freely behaving mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1641-1655.
186. Howard RS, Holmes PA, Koutroumanidis MA. Hypoxic-ischaemic brain injury. *Pract Neurol.* 2011;11(1):4-18.
187. Howarth C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front Neurosci.* 2014;8:103.
188. Hsu YC, Hsu CH, Tseng WY. A large deformation diffeomorphic metric mapping solution for diffusion spectrum imaging datasets. *Neuroimage.* 2012;63(2):818-34.
189. Hukkelhoven CW, Steyerberg EW, Rampen AJ, Farace E, Habbema JD, Marshall LF, Murray GD, Maas AI. Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5600 patients. *J Neurosurg.* 2003;99(4):666-73.
190. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* 2017;96(1):17-42.
191. Iadecola C, Gorelick PB. The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke.* 2005;36(2):182-185.
192. Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Ota A, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to ischaemic excitotoxicity through prostaglandin E₂ EP₃ receptors. *Br J Pharmacol.* 2010;160(4):847-859.
193. Imbrici P, Camerino DC, Tricarico D. Major channels involved in neuropsychiatric disorders and therapeutic perspectives. *Front Genet.* 2013;4:76.
194. Ingall T, Asplund K, Mähönen M, Bonita R. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke.* 2000;31(5):1054-1061.

195. Isagai T, Fujimura N, Tanaka E, Yamamoto S, Higashi H. Membrane dysfunction induced by in vitro ischemia in immature rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol.* 1999;81(4):1866-1871.
196. Jackman K, Iadecola C. Neurovascular regulation in the ischemic brain. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(2):149-160.
197. Joshi I, Andrew RD. Imaging anoxic depolarization during ischemia-like conditions in the mouse hemi-brain slice. *J Neurophysiol.* 2001;85(1):414-424.
198. Katsura K, Asplund B, Ekholm A, Siesjö BK. Extra- and Intracellular pH in the Brain During Ischaemia, Related to Tissue Lactate Content in Normo- and Hypercapnic rats. *Eur J Neurosci.* 1992;4(2):166-176.
199. Kawauchi S, Sato S, Ooigawa H, Nawashiro H, Ishihara M, Kikuchi M. Simultaneous measurement of changes in light absorption due to the reduction of cytochrome c oxidase and light scattering in rat brains during loss of tissue viability. *Appl Opt.* 2008;47(22):4164-4176.
200. Khennouf L, Gesslein B, Lind BL, van den Maagdenberg AM, Lauritzen M. Activity-dependent calcium, oxygen, and vascular responses in a mouse model of familial hemiplegic migraine type 1. *Ann Neurol.* 2016;80(2):219-232.
201. Kim KJ, Iddings JA, Stern JE, Blanco VM, Croom D, Kirov SA, Filosa JA. Astrocyte contributions to flow/pressure-evoked parenchymal arteriole vasoconstriction. *J Neurosci.* 2015;35(21):8245-8257.
202. Kitahara Y, Taga K, Abe H, Shimoji K. The effects of anesthetics on cortical spreading depression elicitation and c-fos expression in rats. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2001;13(1):26-32.
203. Klass A, Sánchez-Porras R, Santos E. Systematic review of the pharmacological agents that have been tested against spreading depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(7):1149-1179. doi: 10.1177/0271678X18771440.
204. Koçak H, Oner P, Oztas B. Comparison of the activities of Na(+),K(+)-ATPase in brains of rats at different ages. *Gerontology.* 2002;48(5):279-281.
205. Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 2004;129(4):1045-1056.
206. Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(21):E1387-E1395.
207. Koroleva VI, Bures J. Circulation of cortical spreading depression around electrically stimulated areas and epileptic foci in the neocortex of rats. *Brain Res.* 1979;173(2):209-215.
208. Koroleva VI, Bures J. The use of spreading depression waves for acute and long-term monitoring of the penumbra zone of focal ischemic damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(8):3710-3714.
209. Kraig RP, Ferreira-Filho CR, Nicholson C. Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol.* 1983;49(3):831-850.
210. Krüger H, Heinemann U, Luhmann HJ. Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *Neuroreport.* 1999;10(12):2651-6.
211. Kudo C, Nozari A, Moskowitz MA, Ayata C. The impact of anesthetics and hyperoxia on cortical spreading depression. *Exp Neurol.* 2008;212(1):201-6.
212. Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front Neurosci.* 2015;9:473.
213. Kuschinsky W, Wahl M. Local chemical and neurogenic regulation of cerebral vascular resistance. *Physiol Rev.* 1978;58(3):656-689.
214. Kuschinsky W, Wahl M. Perivascular pH and pial arterial diameter during bicuculline induced seizures in cats. *Pflugers Arch.* 1979;382(1):81-85.
215. Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, Thurau K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res.* 1972;31(2):240-247.
216. Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreirós N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EM, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E, Cauli B. COX-2-Derived Prostaglandin E₂ Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 2015;35(34):11791-11810.
217. LaManna JC, McCracken KA. The use of neutral red as an intracellular pH indicator in rat brain cortex in vivo. *Anal Biochem.* 1984;142(1):117-125.
218. Lapi D, Colantuoni A. Remodeling of Cerebral Microcirculation after Ischemia-Reperfusion. *J Vasc Res.* 2015;52(1):22-31.
219. Larsen BR, MacAulay N. Activity-dependent astrocyte swelling is mediated by pH-regulating mechanisms. *Glia.* 2017;65(10):1668-1681.
220. Lassen NA. Brain extracellular pH: the main factor controlling cerebral blood flow. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;22(4):247-251.
221. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:385-399.
222. Lauritzen M. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia.* 2001;21(7):757-760.

223. Lauritzen M. Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984;4(4):546-554.
224. Lauritzen M. Regional cerebral blood flow during cortical spreading depression in rat brain: increased reactive hyperperfusion in low-flow states. *Acta Neurol Scand.* 1987;75(1):1-8.
225. Lauritzen M, Fabricius M. Real time laser-Doppler perfusion imaging of cortical spreading depression in rat neocortex. *Neuroreport.* 1995;6(9):1271-1273.
226. Lauritzen M, Hansen AJ, Kronborg D, Wieloch T. Cortical spreading depression is associated with arachidonic acid accumulation and preservation of energy charge. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10(1):115-122.
227. Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7: 359-390.
228. Lecrux C, Sandoe CH, Neupane S, Kropf P, Toussay X, Tong XK, Lacalle-Aurioles M, Shmuel A, Hamel E. Impact of Altered Cholinergic Tones on the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *J Neurosci.* 2017;37(6):1518-1531.
229. Lecrux C, Toussay X, Kocharyan A, Fernandes P, Neupane S, Lévesque M, Plaisier F, Shmuel A, Cauli B, Hamel E. Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci.* 2011;31(27):9836-47.
230. Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia.* 2005;50(4):407-416.
231. Li B, Chen S, Zeng S, Luo Q, Li P. Modeling the contributions of Ca²⁺ flows to spontaneous Ca²⁺ oscillations and cortical spreading depression-triggered Ca²⁺ waves in astrocyte networks. *PLoS One.* 2012;7(10):e48534.
232. Li J, Liang X, Wang Q, Breyer RM, McCullough L, Andreasson K. Misoprostol, an anti-ulcer agent and PGE₂ receptor agonist, protects against cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2008;438(2):210-215.
233. Li P, Ni S, Zhang L, Zeng S, Luo Q. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging. *Opt Lett.* 2006;31(12):1824-1826.
234. Liang X, Lin L, Woodling NS, Wang Q, Anacker C, Pan T, Merchant M, Andreasson K. Signaling via the prostaglandin E₂ receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4362-4371.
235. Liu F, McCullough LD. Interactions between age, sex, and hormones in experimental ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2012;61(8):1255-1265.
236. Liu F, Yuan R, Benashski SE, McCullough LD. Changes in experimental stroke outcome across the life span. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(4):792-802.
237. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1431-1568.
238. Longden TA, Dabertrand F, Koide M, Gonzales AL, Tykocki NR, Brayden JE, Hill-Eubanks D, Nelson MT. Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 2017;20(5):717-726.
239. Lückl J, Zhou C, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. Characterization of periinfarct flow transients with laser speckle and Doppler after middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurosci Res.* 2009;87(5):1219-1229.
240. Ma HT, Wu CH, Wu JY. Initiation of spontaneous epileptiform events in the rat neocortex in vivo. *J Neurophysiol.* 2004;91(2):934-945.
241. Magge SN, Chen HI, Ramakrishna R, Cen L, Chen Z, Elliott JP, Winn HR, Le Roux PD. Association of a younger age with an increased risk of angiographic and symptomatic vasospasms following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2010;112(6):1208-15.
242. Magnotta VA, Heo HY, Dlouhy BJ, Dahdaleh NS, Follmer RL, Thedens DR, Welsh MJ, Wemmie JA. Detecting activity-evoked pH changes in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(21):8270-3.
243. Magnusson KR, Brim BL, Das SR. Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. *Front Aging Neurosci.* 2010;2:11.
244. Major S, Petzold GC, Reiffurth C, Windmüller O, Foddiss M, Lindauer U, Kang EJ, Dreier JP. A role of the sodium pump in spreading ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1687-1705.
245. Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* 2008;52(1-2):142-54.
246. Mares P, Kríz N, Brozek G, Bures J. Anoxic changes of extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of young rats. *Exp Neurol.* 1976;53(1):12-20.
247. Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. Perspectives on spreading depression. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32(1):215-234.
248. Maslarova A, Alam M, Reiffurth C, Lapilover E, Gorji A, Dreier JP. Chronically epileptic human and rat neocortex display a similar resistance against spreading depolarization in vitro. *Stroke.* 2011;42(10):2917-2922.
249. Matsuura T, Bures J. The minimum volume of depolarized neural tissue required for triggering cortical spreading depression in rat. *Exp Brain Res.* 1971;12(3):238-49.

250. Mayer SA, Helbok R. Spreading depolarization: A mysterious and deadly mediator of acute brain injury. *Neurology*. 2018 Dec 28. pii: 10.1212/WNL.0000000000006803. doi: 10.1212/WNL.0000000000006803.
251. Mayevsky A, Chance B. Metabolic responses of the awake cerebral cortex to anoxia hypoxia spreading depression and epileptiform activity. *Brain Res*. 1975;98(1):149-65.
252. Mayevsky A, Manor T, Meilin S, Doron A, Ouaknine GE. Real-time multiparametric monitoring of the injured human cerebral cortex—a new approach. *Acta Neurochir Suppl*. 1998;71:78-81.
253. Mayevsky A, Weiss HR. Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11(5):829-836.
254. Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM, Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress. *Microcirculation*. 2008;15(3):225-236.
255. Mayzel-Oreg O, Omae T, Kazemi M, Li F, Fisher M, Cohen Y, Sotak CH. Microsphere-induced embolic stroke: an MRI study. *Magn Reson Med*. 2004;51(6):1232-1238.
256. McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004;24(1):257-268.
257. Menna G, Tong CK, Chesler M. Extracellular pH changes and accompanying cation shifts during ouabain-induced spreading depression. *J Neurophysiol*. 2000;83(3):1338-1345.
258. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM Jr, Yaksh TL. Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion, electroencephalography, and histology in severe and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1986;6(1):71-78.
259. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport*. 1993;4(6):709-11.
260. Mies G, Paschen W. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Exp Neurol*. 1984;84(2):249-58.
261. Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6500-6505.
262. Milner, PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leão. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1958;10(4):705.
263. Miyake K, Takeo S, Kaijihar H. Sustained decrease in brain regional blood flow after microsphere embolism in rats. *Stroke*. 1993;24(3):415-420.
264. Mizrahi A, Crowley JC, Shtoyerman E, Katz LC. High-resolution in vivo imaging of hippocampal dendrites and spines. *J Neurosci*. 2004;24(13):3147-51.
265. Moyer JR Jr, Thompson LT, Black JP, Disterhoft JF. Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. *J Neurophysiol*. 1992;68(6):2100-2109.
266. Murphy TH, Li P, Betts K, Liu R. Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *J Neurosci*. 2008;28(7):1756-72.
267. Mutch WA, Hansen AJ. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1984;4(1):17-27.
268. Myren M, Baun M, Ploug KB, Jansen-Olesen I, Olesen J, Gupta S. Functional and molecular characterization of prostaglandin E2 dilatory receptors in the rat craniovascular system in relevance to migraine. *Cephalalgia*. 2010;30(9):1110-1122.
269. Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sué M, Kracht L, Hashemi P, Bhatia R, Yoshimine T, Dreier JP, Dunn AK, Graf R. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1994-2006.
270. Nedergaard M. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol*. 1996;71:75-83; discussion 83-84.
271. Nedergaard M, Astrup J. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1986;6(5):607-15.
272. Nedergaard M, Goldman SA, Desai S, Pulsinelli WA. Acid-induced death in neurons and glia. *J Neurosci*. 1991;11(8):2489-2497.
273. Nedergaard M, Hansen AJ. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13(4):568-574.
274. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11(11):462-8.
275. Nielsen AN, Fabricius M, Lauritzen M. Scanning laser-Doppler flowmetry of rat cerebral circulation during cortical spreading depression. *J Vasc Res*. 2000;37(6):513-522.

276. Nishimura M, Shirasawa H, Kaizo H, Song WJ. New field with tonotopic organization in guinea pig auditory cortex. *J Neurophysiol.* 2007;97(1):927-932.
277. Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci.* 2000;20(2):763-770.
278. Niwa K, Haensel C, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res.* 2001;88(6):600-608.
279. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci.* 1997;17(8):2746-2755.
280. 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(7):749-57.
281. Nowicki JP, Assumel-Lurdin C, Duverger D, MacKenzie ET. Temporal evolution of regional energy metabolism following focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988 Aug;8(4):462-473.
282. Nozari A, Dilekoz E, Sukhotinsky I, Stein T, Eikermann-Haerter K, Liu C, Wang Y, Frosch MP, Waeber C, Ayata C, Moskowitz MA. Microemboli may link spreading depression, migraine aura, and patent foramen ovale. *Ann Neurol.* 2010;67(2):221-229.
283. Obrenovitch TP, Garofalo O, Harris RJ, Bordi L, Ono M, Momma F, Bachelard HS, Symon L. Brain tissue concentrations of ATP, phosphocreatine, lactate, and tissue pH in relation to reduced cerebral blood flow following experimental acute middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(6):866-874.
284. Obrenovitch TP, Wang M, Urenjak J, Butler MJ, Dreier JP. The role(s) of nitric oxide during cortical spreading depression. 2004; In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia* (Kriegelstein J, Klumpp S, eds), Stuttgart: Medpharm, 157–166.
285. Offenhauser N, Windmüller O, Strong AJ, Fuhr S, Dreier JP. The gamut of blood flow responses coupled to spreading depolarization in rat and human brain: from hyperemia to prolonged ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 2011;110(Pt 1):119-24.
286. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol.* 2006;119(3):229-240.
287. Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P, Iadecola C. Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(12):1908-1918.
288. Parkin M, Hopwood S, Jones DA, Hashemi P, Landolt H, Fabricius M, Lauritzen M, Boutelle MG, Strong AJ. Dynamic changes in brain glucose and lactate in pericontusional areas of the human cerebral cortex, monitored with rapid sampling on-line microdialysis: relationship with depolarisation-like events. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(3):402-413.
289. Petcu EB, Sfredel V, Platt D, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review. *Gerontology.* 2008;54(1):6-17.
290. Peek KE, Lockwood AH, Izumiyama M, Yap EW, Labove J. Glucose metabolism and acidosis in the metabolic penumbra of rat brain. *Metab Brain Dis.* 1989;4(4):261-272.
291. Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL, Magistretti PJ. Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3990-5.
292. Petruk KC, West M, Mohr G, Weir BK, Benoit BG, Gentili F, Disney LB, Khan MI, Grace M, Holness RO, et al. Nimodipine treatment in poor-grade aneurysm patients. Results of a multicenter double-blind placebo-controlled trial. *J Neurosurg.* 1988;68(4):505-17.
293. Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron.* 2008;58(6):897-910.
294. Petzold GC, Windmüller O, Haack S, Major S, Buchheim K, Megow D, Gabriel S, Lehmann TN, Drenckhahn C, Peters O, Meierkord H, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP. Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke.* 2005;36(6):1270-7.
295. Phillips JM, Nicholson C. Anion permeability in spreading depression investigated with ion-sensitive microelectrodes. *Brain Res.* 1979;173(3):567-71.
296. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 2005;94(1):1-14.
297. Pietrobon D, Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(6):379-93.
298. Piper RD, Lambert GA, Duckworth JW. Cortical blood flow changes during spreading depression in cats. *Am J Physiol.* 1991;261(1 Pt 2):H96-102.

299. Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol.* 2007;113(3):277-93.
300. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 1985;63:29-37.
301. Rabb CH, Tang G, Chin LS, Giannotta SL. A statistical analysis of factors related to symptomatic cerebral vasospasm. *Acta Neurochir (Wien).* 1994;127(1-2):27-31.
302. Rami A, Kriegelstein J. Neuronal protective effects of calcium antagonists in cerebral ischemia. *Life Sci.* 1994;55(25-26):2105-13.
303. Rampil IJ, Litt L, Mayevsky A. Correlated, simultaneous, multiple-wavelength optical monitoring in vivo of localized cerebrocortical NADH and brain microvessel hemoglobin oxygen saturation. *J Clin Monit.* 1992;8(3):216-25.
304. Redecker C, Hagemann G, Köhling R, Straub H, Witte OW, Speckmann EJ. Optical imaging of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations. *Exp Neurol.* 2005;192(2):288-98.
305. Rehncrona S. Brain acidosis. *Ann Emerg Med.* 1985;14(8):770-6.
306. Reinhart KM, Shuttleworth CW. Ketamine reduces deleterious consequences of spreading depolarizations. *Exp Neurol.* 2018;305:121-128.
307. Richter F, Ebersberger A, Schaible HG. Blockade of voltage-gated calcium channels in rat inhibits repetitive cortical spreading depression. *Neurosci Lett.* 2002;334(2):123-6.
308. Richter F, Lehmenkühler A. Spreading depression can be restricted to distinct depths of the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 1993;152(1-2):65-8.
309. Richter F, Lehmenkühler A, Fechner R, Manveljan L, Haschke W. Postnatal conditioning for spreading cortical depression in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;106(1-2):217-21.
310. Rimmele TS, Rosenberg PA. LT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2016 Sep;98:19-28.
311. Risher WC, Ard D, Yuan J, Kirov SA. Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra. *J Neurosci.* 2010;30(29):9859-68.
312. Risher WC, Croom D, Kirov SA. Persistent astroglial swelling accompanies rapid reversible dendritic injury during stroke-induced spreading depolarizations. *Glia.* 2012;60(11):1709-20.
313. Roberts EL Jr, Rosenthal M, Sick TJ. Age-related modifications of potassium homeostasis and synaptic transmission during and after anoxia in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1990;514(1):111-8.
314. Rogatsky GG, Sonn J, Kamenir Y, Zarchin N, Mayevsky A. Relationship between intracranial pressure and cortical spreading depression following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2003;20(12):1315-25.
315. Rosenegger DG, Tran CH, Wamsteeker Cusulin JI, Gordon GR. Tonic Local Brain Blood Flow Control by Astrocytes Independent of Phasic Neurovascular Coupling. *J Neurosci.* 2015;35(39):13463-74.
316. Rosenthal M, Somjen G. Spreading depression, sustained potential shifts, and metabolic activity of cerebral cortex of cats. *J Neurophysiol.* 1973 Jul;36(4):739-49.
317. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1377-86.
318. Röther J, de Crespigny AJ, D'Arceuil H, Mosley ME. MR detection of cortical spreading depression immediately after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(2):214-20.
319. Ruth B. Blood flow determination by the laser speckle method. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1990;9(1):21-45.
320. Saito R, Graf R, Hübel K, Fujita T, Rosner G, Heiss WD. Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(8):857-64.
321. Sakai H, Sheng H, Yates RB, Ishida K, Pearlstein RD, Warner DS. Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology.* 2007;106(1):92-9; discussion 8-10.
322. Sakowitz OW, Kiening KL, Krajewski KL, Sarrafzadeh AS, Fabricius M, Strong AJ, Unterberg AW, Dreier JP. Preliminary evidence that ketamine inhibits spreading depolarizations in acute human brain injury. *Stroke.* 2009;40(8):e519-22.
323. Sánchez-Porrás R, Santos E, Schöll M, Kunzmann K, Stock C, Silos H, Unterberg AW, Sakowitz OW. Ketamine modulation of the haemodynamic response to spreading depolarization in the gyrencephalic swine brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1720-1734.
324. Sánchez-Porrás R, Santos E, Schöll M, Stock C, Zheng Z, Schiebel P, Orakcioglu B, Unterberg AW, Sakowitz OW. The effect of ketamine on optical and electrical characteristics of spreading depolarizations in gyrencephalic swine cortex. *Neuropharmacology.* 2014;84:52-61.
325. Sánchez-Porrás R, Zheng Z, Sakowitz OW. Pharmacological modulation of spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl.* 2015;120:153-7.

326. Santos E, León F, Silos H, Sanchez-Porras R, Shuttleworth CW, Unterberg A, Sakowitz OW. Incidence, hemodynamic, and electrical characteristics of spreading depolarization in a swine model are affected by local but not by intravenous application of magnesium. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(12):2051-2057.
327. Santos E, Sánchez-Porras R, Sakowitz OW, Dreier JP, Dahlem MA. Heterogeneous propagation of spreading depolarizations in the lissencephalic and gyrencephalic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(7):2639-2643.
328. Santos E, Schöll M, Sanchez-Porras R, Kentar M, Orakcioglu B, Unterberg A, Dickhaus H, Sakowitz OW. Cortical spreading depression dynamics can be studied using intrinsic optical signal imaging in gyrencephalic animal cortex. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;118:93-7.
329. Sasaki T, Takeda Y, Taninishi H, Arai M, Shiraishi K, Morita K. Dynamic changes in cortical NADH fluorescence in rat focal ischemia: evaluation of the effects of hypothermia on propagation of peri-infarct depolarization by temporal and spatial analysis. *Neurosci Lett.* 2009;449(1):61-65.
330. Satoh M, Asai S, Katayama Y, Kohno T, Ishikawa K. Real-time monitoring of glutamate transmitter release with anoxic depolarization during anoxic insult in rat striatum. *Brain Res.* 1999;822(1-2):142-8.
331. Schade JP. Maturational aspects of EEG and of spreading depression in rabbit. *J Neurophysiol.* 1959;22(3):245-257.
332. Scheller D, Kolb J, Tegtmeier F. Lactate and pH change in close correlation in the extracellular space of the rat brain during cortical spreading depression. *Neurosci Lett.* 1992;135(1):83-86.
333. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682.
334. Scriabine A, Schuurman T, Traber J. Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. *FASEB J.* 1989;3(7):1799-1806.
335. Selman WR, Lust WD, Pundik S, Zhou Y, Ratcheson RA. Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res.* 2004;999(2):167-74.
336. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013 Jun;4(6):624-630.
337. Sesti F. Oxidation of K(+) Channels in Aging and Neurodegeneration. *Aging Dis.* 2016;7(2):130-135.
338. Shah NH, Aizenman E. Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl Stroke Res.* 2014;5(1):38-58.
339. Shatillo A, Salo RA, Giniatullin R, Gröhn OH. Involvement of NMDA receptor subtypes in cortical spreading depression in rats assessed by fMRI. *Neuropharmacology.* 2015;93:164-170.
340. Sheehan JJ, Benedetti BL, Barth AL. Anticonvulsant effects of the BK-channel antagonist paxilline. *Epilepsia.* 2009;50(4):711-20.
341. Shen PP, Hou S, Ma D, Zhao MM, Zhu MQ, Zhang JD, Feng LS, Cui L, Feng JC. Cortical spreading depression-induced preconditioning in the brain. *Neural Regen Res.* 2016;11(11):1857-1864.
342. Shibata M, Leffler CW, Busija DW. Prostanoids attenuate pial arteriolar dilation induced by cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol.* 1991;261(4 Pt 2):R828-R834.
343. Shibata M, Leffler CW, Busija DW. Pial arteriolar constriction following cortical spreading depression is mediated by prostanoids. *Brain Res.* 1992;572(1-2):190-197.
344. Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(8):1018-1030.
345. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med.* 1988;16(10):954-963.
346. Siesjö BK, Katsura KI, Kristián T, Li PA, Siesjö P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;66:8-14.
347. Soares JK, Rocha-de-Melo AP, Medeiros MC, Queiroga RC, Bomfim MA, de Souza AF, Nascimento AL, Guedes RC. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(10):1490-5.
348. Somerville LH. Searching for Signatures of Brain Maturity: What Are We Searching For? *Neuron.* 2016;92(6):1164-1167.
349. Somjen GG. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1979;41:159-177.
350. Somjen GG. Acidification of interstitial fluid in hippocampal formation caused by seizures and by spreading depression. *Brain Res.* 1984;311(1):186-188.
351. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1065-1096.
352. Sonn J, Mayevsky A. The effect of ethanol on metabolic, hemodynamic and electrical responses to cortical spreading depression. *Brain Res.* 2001;908(2):174-186.

353. Sonn J, Mayevsky A. Responses to Cortical Spreading Depression under Oxygen Deficiency. *Open Neurol J.* 2012;6:6-17.
354. Sotelo-Hitschfeld T, Niemeier MI, Mächler P, Ruminot I, Lerchundi R, Wyss MT, Stobart J, Fernández-Moncada I, Valdebenito R, Garrido-Gerter P, Contreras-Baeza Y, Schneider BL, Aebischer P, Lengacher S, San Martín A, Le Douce J, Bonvento G, Magistretti PJ, Sepúlveda FV, Weber B, Barros LF. Channel-mediated lactate release by K⁺-stimulated astrocytes. *J Neurosci.* 2015;35(10):4168-4178.
355. Spong KE, Andrew RD, Robertson RM. Mechanisms of spreading depolarization in vertebrate and insect central nervous systems. *J Neurophysiol.* 2016;116(3):1117-27.
356. Steffensen AB, Sword J, Croom D, Kirov SA, MacAulay N. Chloride Cotransporters as a Molecular Mechanism underlying Spreading Depolarization-Induced Dendritic Beading. *J Neurosci.* 2015;35(35):12172-12187.
357. Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, Virley DJ, Lloyd A, Irving EA, Nagafuji T, Ninomiya M, Nakamura H, Dunn AK, Graf R. Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain.* 2007;130(Pt 4):995-1008.
358. Strong AJ, Bezzina EL, Anderson PJ, Boutelle MG, Hopwood SE, Dunn AK. Evaluation of laser speckle flowmetry for imaging cortical perfusion in experimental stroke studies: quantitation of perfusion and detection of peri-infarct depolarisations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(5):645-653.
359. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke.* 2002 Dec;33(12):2738-43.
360. Strong AJ, Smith SE, Whittington DJ, Meldrum BS, Parsons AA, Krupinski J, Hunter AJ, Patel S, Robertson C. Factors influencing the frequency of fluorescence transients as markers of peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000;31(1):214-22.
361. Sugimoto K, Shirao S, Koizumi H, Inoue T, Oka F, Maruta Y, Suehiro E, Sadahiro H, Oku T, Yoneda H, Ishihara H, Nomura S, Suzuki M. Continuous Monitoring of Spreading Depolarization and Cerebrovascular Autoregulation after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25(10):e171-e177.
362. Sukhotinsky I, Dilekoz E, Moskowitz MA, Ayata C. Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(7):1369-1376.
363. Sun XL, Hu G. ATP-sensitive potassium channels: a promising target for protecting neurovascular unit function in stroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(2):243-52.
364. Sun X, Wang Y, Chen S, Luo W, Li P, Luo Q. Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. *Neuroimage.* 2011;57(3):873-884.
365. Sunami K, Nakamura T, Kubota M, Ozawa Y, Namba H, Yamaura A, Makino H. Spreading depression following experimental head injury in the rat. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1989;29(11):975-80.
366. Sutherland BA, Fordsmann JC, Martin C, Neuhaus AA, Witgen BM, Piilgaard H, Lønstrup M, Couch Y, Sibson NR, Lauritzen M, Buchan AM. Multi-modal assessment of neurovascular coupling during cerebral ischaemia and reperfusion using remote middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Jul;37(7):2494-2508.
367. Szabó Í, M. Tóth O, Török Z, Varga DP, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Hunya Á, Bari F, Horváth I, Vigh L, Farkas E. The impact of dihydropyridine derivatives on the cerebral blood flow response to somatosensory stimulation and spreading depolarization. *Br J Pharmacol.* 2019, accepted ms.
368. Szabó Í, Brain absztrakt
369. Takagaki M, Feuerstein D, Kumagai T, Gramer M, Yoshimine T, Graf R. Isoflurane suppresses cortical spreading depolarizations compared to propofol--implications for sedation of neurocritical care patients. *Exp Neurol.* 2014;252:12-7.
370. Takano K, Latour LL, Formato JE, Carano RA, Helmer KG, Hasegawa Y, Sotak CH, Fisher M. The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Ann Neurol.* 1996;39(3):308-18.
371. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):260-267.
372. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, Kasischke KA, Nedergaard M. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci.* 2007;10(6):754-762.
373. Takaoka S, Pearlstein RD, Warner DS. Hypothermia reduces the propensity of cortical tissue to propagate direct current depolarizations in the rat. *Neurosci Lett.* 1996;218(1):25-28.
374. Takeda Y, Zhao L, Jacewicz M, Pulsinelli WA, Nowak TS Jr. Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(9):1863-1873.
375. Tamaki Y, Araie M, Kawamoto E, Eguchi S, Fujii H. Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(11):3825-3834.

376. Tanaka K, Dora E, Greenberg JH, Reivich M. Cerebral glucose metabolism during the recovery period after ischemia--its relationship to NADH-fluorescence, blood flow, EcoG and histology. *Stroke*. 1986;17(5):994-1004.
377. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(16):6445-9.
378. Tang YT, Mendez JM, Theriot JJ, Sawant PM, López-Valdés HE, Ju YS, Brennan KC. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol*. 2014;112(10):2572-9.
379. Tarantini S, Tran CHT, Gordon GR, Ungvari Z, Csiszar A. Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Exp Gerontol*. 2017;94:52-58.
380. Tettenborn D, Dycka J. Prevention and treatment of delayed ischemic dysfunction in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1990;21(12 Suppl):IV85-9.
381. Thrane AS, Takano T, Rangroo Thrane V, Wang F, Peng W, Ottersen OP, Nedergaard M, Nagelhus EA. In vivo NADH fluorescence imaging indicates effect of aquaporin-4 deletion on oxygen microdistribution in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(7):996-9.
382. Tombaugh GC. Mild acidosis delays hypoxic spreading depression and improves neuronal recovery in hippocampal slices. *J Neurosci*. 1994;14(9):5635-43.
383. Tombaugh GC, Somjen GG. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol*. 1996;493 (Pt 3):719-32.
384. Tong CK, Chesler M. Modulation of spreading depression by changes in extracellular pH. *J Neurophysiol*. 2000;84(5):2449-57.
385. Toth P, Szarka N, Farkas E, Ezer E, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A. Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(5):H1118-H1131.
386. Toth P, Tarantini S, Ashpole NM, Tucsek Z, Milne GL, Valcarcel-Ares NM, Menyhart A, Farkas E, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. IGF-1 deficiency impairs neurovascular coupling in mice: implications for cerebrovascular aging. *Aging Cell*. 2015;14(6):1034-44.
387. Toth P, Tarantini S, Tucsek Z, Ashpole NM, Sosnowska D, Gautam T, Ballabh P, Koller A, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(3):H299-308.
388. Toth P, Tucsek Z, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Tarantini S, Deak F, Koller A, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(11):1732-42.
389. Tran CH, Gordon GR. Astrocyte and microvascular imaging in awake animals using two-photon microscopy. *Microcirculation*. 2015;22(3):219-27.
390. Tsai MJ, Tsai YH, Kuo YM. Characterization of the pattern of ischemic stroke induced by artificial particle embolization in the rat brain. *Biomaterials*. 2011;32(27):6381-8.
391. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44(2):85-95.
392. Umegaki M, Sanada Y, Waerzeggers Y, Rosner G, Yoshimine T, Heiss WD, Graf R. Peri-infarct depolarizations reveal penumbra-like conditions in striatum. *J Neurosci*. 2005;25(6):1387-94.
393. Unekawa M, Tomita Y, Masamoto K, Toriumi H, Osada T, Kanno I, Suzuki N. Dynamic diameter response of intraparenchymal penetrating arteries during cortical spreading depression and elimination of vasoreactivity to hypercapnia in anesthetized mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(2):657-670.
394. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(10):1028-41.
395. van den Bergh WM, Zuur JK, Kamerling NA, van Asseldonk JT, Rinkel GJ, Tulleken CA, Nicolay K. Role of magnesium in the reduction of ischemic depolarization and lesion volume after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2002;97(2):416-22.
396. van der Hel WS, van den Bergh WM, Nicolay K, Tulleken KA, Dijkhuizen RM. Suppression of cortical spreading depressions after magnesium treatment in the rat. *Neuroreport*. 1998;9(10):2179-82.
397. van Harreveld, A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem*. 1959;3(4):300-15.
398. Vanzetta I, Hildesheim R, Grinvald A. Compartment-resolved imaging of activity-dependent dynamics of cortical blood volume and oximetry. *J Neurosci*. 2005;25(9):2233-2244.
399. Viitanen T, Ruusuvoori E, Kaila K, Voipio J. The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *J Physiol*. 2010;588(Pt 9):1527-40.

400. Villa RF, Gorini A, Hoyer S. ATPases of synaptic plasma membranes from hippocampus after ischemia and recovery during ageing. *Neurochem Res.* 2002;27(9):861-870.
401. Vinogradova LV, Koroleva VI, Bures J. Re-entry waves of Leao's spreading depression between neocortex and caudate nucleus. *Brain Res.* 1991;538(1):161-164.
402. Voipio J, Kaila K. Interstitial PCO₂ and pH in rat hippocampal slices measured by means of a novel fast CO₂/H(+)-sensitive microelectrode based on a PVC-gelled membrane. *Pflugers Arch.* 1993;423(3-4):193-201.
403. von Bornstädt D, Houben T, Seidel JL, Zheng Y, Dilekoz E, Qin T, Sandow N, Kura S, Eikermann-Haerter K, Endres M, Boas DA, Moskowitz MA, Lo EH, Dreier JP, Woitzik J, Sakadžić S, Ayata C. Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origins of spreading injury depolarizations. *Neuron.* 2015;85(5):1117-1131.
404. Vyskocil F, Kritz N, Bures J. Potassium-selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarization in rats. *Brain Res.* 1972;39(1):255-259.
405. Walz W, Mukerji S. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia.* 1988;1(6):366-370.
406. Wang H, Hitron IM, Iadecola C, Pickel VM. Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 2005;15(8):1250-1260.
407. Wang M, Chazot PL, Ali S, Duckett SF, Obrenovitch TP. Effects of NMDA receptor antagonists with different subtype selectivities on retinal spreading depression. *Br J Pharmacol.* 2012;165(1):235-244.
408. Wang Z, Li P, Luo W, Chen S, Luo Q. Peri-infarct temporal changes in intrinsic optical signal during spreading depression in focal ischemic rat cortex. *Neurosci Lett.* 2007;424(2):133-138.
409. Wang H, Li P, Xu N, Zhu L, Cai M, Yu W, Gao Y. Paradigms and mechanisms of inhalational anesthetics mediated neuroprotection against cerebral ischemic stroke. *Med Gas Res.* 2016;6(4):194-205.
410. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 2004;207(Pt 18):3221-3231.
411. Wiernsperger N, Sylvia AL, Jöbsis FF. Incomplete transient ischemia: a non-destructive evaluation of in vivo cerebral metabolism and hemodynamics in rat brain. *Stroke.* 1981;12(6):864-868.
412. Willette RN, Lysko PG, Sauermelech CF. A comparison of (+)SK&F 10047 and MK-801 on cortical spreading depression. *Brain Res.* 1994;648(2):347-351.
413. Windmüller O, Lindauer U, Foddis M, Einhüpl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain.* 2005;128(Pt 9):2042-2051.
414. Winkler MK, Dengler N, Hecht N, Hartings JA, Kang EJ, Major S, Martus P, Vajkoczy P, Woitzik J, Dreier JP. Oxygen availability and spreading depolarizations provide complementary prognostic information in neuromonitoring of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1841-1856.
415. Woitzik J, Hecht N, Pinczolits A, Sandow N, Major S, Winkler MK, Weber-Carstens S, Dohmen C, Graf R, Strong AJ, Dreier JP, Vajkoczy P; COSBID study group. Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology.* 2013;80(12):1095-102.
416. Wolf T, Lindauer U, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, Dirnagl U. Systemic nitric oxide synthase inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression in rats: a noninvasive near-infrared spectroscopy and laser-Doppler flowmetry study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1100-7.
417. Wolf T, Lindauer U, Reuter U, Back T, Villringer A, Einhüpl K, Dirnagl U. Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(9):950-4.
418. Xie Y, Zacharias E, Hoff P, Tegtmeier F. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15(4):587-94.
419. Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4754-71.
420. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med.* 2009;15(9):1031-7.
421. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):267-78.
422. Yoon S, Zuccarello M, Rapoport RM. pCO₂ and pH regulation of cerebral blood flow. *Front Physiol.* 2012;3:365.
423. Zandt BJ, ten Haken B, van Putten MJ. Diffusing substances during spreading depolarization: analytical expressions for propagation speed, triggering, and concentration time courses. *J Neurosci.* 2013;33(14):5915-23.
424. Zhao X, Rosenke R, Kronemann D, Brim B, Das SR, Dunah AW, Magnusson KR. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience.* 2009;162(4):933-945.

425. Zhou N, Gordon GR, Feighan D, MacVicar BA. Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cereb Cortex*. 2010;20(11):2614-2624.
426. Zhou N, Rungta RL, Malik A, Han H, Wu DC, MacVicar BA. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(10):1582-94.
427. Shimizu K, Veltkamp R, Busija DW. Characteristics of induced spreading depression after transient focal ischemia in the rat. *Brain Res*. 2000;861(2):316-24.

13. Közleményjegyzék

13.1. A dolgozat alapjául szolgáló, válogatott közlemények

1. Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, **Farkas E**. Susceptibility of the cerebral cortex to spreading depolarization in neurological disease states: The impact of aging. *Neurochem Int.* 2018; pii: S0197-0186(18)30467-4.
2. Menyhárt Á, Farkas AE, Varga DP, Frank R, Tóth R, Bálint AR, Makra P, Dreier JP, Bari F, Krizbai IA, **Farkas E**. Large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels are potently involved in the inverse neurovascular response to spreading depolarization. *Neurobiol Dis.* 2018;119:41-52.
3. Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Bari F, **Farkas E**. Age or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarization in the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;313(2):H328-H337.
4. Menyhárt Á, Zölei-Szénási D, Puskás T, Makra P, Orsolya MT, Szepes BÉ, Tóth R, Ivánkovits-Kiss O, Obrenovitch TP, Bari F, **Farkas E**. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep.* 2017;7(1):1154.
5. Hertelendy P, Menyhárt Á, Makra P, Süle Z, Kiss T, Tóth G, Ivánkovits-Kiss O, Bari F, **Farkas E**. Advancing age and ischemia elevate the electric threshold to elicit spreading depolarization in the cerebral cortex of young adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1763-1775.
6. 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.
7. Menyhárt Á, Makra P, Szepes BÉ, Tóth OM, Hertelendy P, Bari F, **Farkas E**. High incidence of adverse cerebral blood flow responses to spreading depolarization in the aged ischemic rat brain. *Neurobiol Aging.* 2015;36(12):3269-3277.
8. Bere Z, Obrenovitch TP, Kozák G, Bari F, **Farkas E**. Imaging reveals the focal area of spreading depolarizations and a variety of hemodynamic responses in a rat microembolic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(10):1695-705.
9. **Farkas E**, Bari F. Spreading depolarization in the ischemic brain: does aging have an impact? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69(11):1363-70.
10. Clark D, Institoris Á, Kozák G, Bere Z, Tuor U, **Farkas E**, Bari F. Impact of aging on spreading depolarizations induced by focal brain ischemia in rats. *Neurobiol Aging.* 2014;35(12):2803-2811.
11. 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.
12. **Farkas E**, Obrenovitch TP, Institoris Á, Bari F. Effects of early aging and cerebral hypoperfusion on spreading depression in rats. *Neurobiol Aging.* 2011;32(9):1707-15.
13. **Farkas E**, Bari F, Obrenovitch TP. Multi-modal imaging of anoxic depolarization and hemodynamic changes induced by cardiac arrest in the rat cerebral cortex. *Neuroimage.* 2010;51(2):734-42.
14. Obrenovitch TP, Chen S, **Farkas E**. Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods. *Neuroimage.* 2009;45(1):68-74.
15. **Farkas E**, Obrenovitch TP. Direct, live imaging of stroke-associated cortical spreading depression in experimental models. In *Recent advances and new strategies in stroke research*, Editor: Erdő, F., Transworld Research Network, Kerala, India, 2009; pp. 53-71., ISBN: 978-81-7895-385-4.
16. **Farkas E**, Pratt R, Sengpiel F, Obrenovitch TP. Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarisation using a fluorescent, voltage-sensitive dye. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(2):251-62.
17. **Farkas E**, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2007;54(1):162-80.

13.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények

1. Szabó Í, Tóth OM, Török Z, Varga DP, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Hunya Á, Bari F, Horváth I, Vigh L, **Farkas E**. The impact of dihydropyridine derivatives on the cerebral blood flow response to somatosensory stimulation and spreading depolarization. *Br J Pharmacol*. 2019 Feb 9. doi: 10.1111/bph.14611. [Epub ahead of print]
2. Makra P, Menyhárt Á, Bari F, **Farkas E**. Spectral and Multifractal Signature of Cortical Spreading Depolarisation in Aged Rats. *Front Physiol*. 2018;9:1512.
3. Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, Farkas E.
4. Janovák L, Turcsányi Á, Bozó É, Deák Á, Mérai L, Sebők D, Juhász Á, Csapó E, Abdelghafour MM, **Farkas E**, Dékány I, Bari F. Preparation of novel tissue acidosis-responsive chitosan drug nanoparticles: Characterization and in vitro release properties of Ca²⁺ channel blocker nimodipine drug molecules. *Eur J Pharm Sci*. 2018;123:79-88.
5. Varga DP, Menyhárt Á, Puskás T, Bari F, **Farkas E**, Kis Z, Vécsei L, Toldi J, Gellért L. Systemic administration of l-kynurenine sulfate induces cerebral hypoperfusion transients in adult C57Bl/6 mice. *Microvasc Res*. 2017;114:19-25.
6. Tarantini S, Fulop GA, Kiss T, **Farkas E**, Zölei-Szénási D, Galvan V, Toth P, Csiszar A, Ungvari Z, Yabluchanskiy A. Demonstration of impaired neurovascular coupling responses in TG2576 mouse model of Alzheimer's disease using functional laser speckle contrast imaging. *Geroscience*. 2017;39(4):465-473.
7. Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, Ayata C, Hinzman JM, Foreman B, Andrew RD, Boutelle MG, Brennan KC, Carlson AP, Dahlem MA, Drenckhahn C, Dohmen C, Fabricius M, **Farkas E**, Feuerstein D, Graf R, Helbok R, Lauritzen M, Major S, Oliveira-Ferreira AI, Richter F, Rosenthal ES, Sakowitz OW, Sánchez-Porrás R, Santos E, Schöll M, Strong AJ, Urbach A, Westover MB, Winkler MK, Witte OW, Woitzik J, Dreier JP. The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(5):1571-1594.
8. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, William Shuttleworth C, Dohmen C, Graf R, Vajkoczy P, Helbok R, Suzuki M, Schiefecker AJ, Major S, Winkler MK, Kang EJ, Milakara D, Oliveira-Ferreira AI, Reiffurth C, Revankar GS, Sugimoto K, Dengler NF, Hecht N, Foreman B, Feyen B, Kondziella D, Friberg CK, Piilgaard H, Rosenthal ES, Westover MB, Maslarova A, Santos E, Hertle D, Sánchez-Porrás R, Jewell SL, Balança B, Platz J, Hinzman JM, Lückl J, Schoknecht K, Schöll M, Drenckhahn C, Feuerstein D, Eriksen N, Horst V, Bretz JS, Jahnke P, Scheel M, Bohner G, Rostrup E, Pakkenberg B, Heinemann U, Claassen J, Carlson AP, Kowoll CM, Lublinsky S, Chassidim Y, Shelef I, Friedman A, Brinker G, Reiner M, Kirov SA, Andrew RD, **Farkas E**, Güresir E, Vatter H, Chung LS, Brennan KC, Lieutaud T, Marinesco S, Maas AI, Sahuquillo J, Dahlem MA, Richter F, Herreras O, Boutelle MG, Okonkwo DO, Bullock MR, Witte OW, Martus P, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Dijkhuizen RM, Shutter LA, Andaluz N, Schulte AP, MacVicar B, Watanabe T, Woitzik J, Lauritzen M, Strong AJ, Hartings JA. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(5):1595-1625.
9. Toth P, Szarka N, **Farkas E**, Ezer E, Czeiter E, Amrein K, Ungvari Z, Hartings JA, Buki A, Koller A. Traumatic brain injury-induced autoregulatory dysfunction and spreading depression-related neurovascular uncoupling: Pathomechanisms, perspectives, and therapeutic implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(5):H1118-H1131.
10. Toth P, Tarantini S, Ashpole NM, Tucsek Z, Milne GL, Valcarcel-Ares NM, Menyhárt A, **Farkas E**, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. IGF-1 deficiency impairs neurovascular coupling in mice: implications for cerebrovascular aging. *Aging Cell*. 2015;14(6):1034-44.
11. Di Marco LY, Venneri A, **Farkas E**, Evans PC, Marzo A, Frangi AF. Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease--A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol Dis*. 2015;82:593-606.
12. Di Marco LY, **Farkas E**, Martin C, Venneri A, Frangi AF. Is Vasomotion in Cerebral Arteries Impaired in Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis*. 2015;46(1):35-53.

13. Bere Z, Bari F, Obrenovitch TP, **Farkas E**. Characterization of multifocal cerebral ischemia-induced microvascular changes with multimodal imaging technique in the cerebral cortex of the rat. *Sci Med*. 2012;3(1):57-62.
14. Mracskó É, Hügecz M, **Farkas E**, Domoki F, Bari F. Oxidatív hatások és hatékony antioxidáns terápiás beavatkozások kísérletes agyi ischaemiában. *Vasc Neurol*. 2011;3(2):25-33.
15. Hügecz M, Mracskó E, Hertelendy P, **Farkas E**, Domoki F, Bari F. Hydrogen supplemented air inhalation reduces changes of prooxidant enzyme and gap junction protein levels after transient global cerebral ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res*. 2011;1404:31-8.
16. **Farkas E**, Obrenovitch TP, Bari F. Az agytraumával vagy stroke-kal járó agykérgi kúszó depolarizáció és periinfarctus depolarizáció patofiziológiai jelentősége. *Vasc Neurol*. 2010;2(3):62-7.
17. Mracskó E, Hügecz M, Institoris A, **Farkas E**, Bari F. Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res*. 2010;1321:13-9.
18. Oomen CA, **Farkas E**, Roman V, van der Beek EM, Luiten PG, Meerlo P. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Front Aging Neurosci*. 2009;1:4.
19. Süle Z, Mracskó E, Bereczki E, Sántha M, Csont T, Ferdinandy P, Bari F, **Farkas E**. Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein B-100 transgenic mice. *Life Sci*. 2009;84(25-26):935-9.
20. Institoris A, **Farkas E**, Berczi S, Süle Z, Bari F. Effects of cyclooxygenase (COX) inhibition on memory impairment and hippocampal damage in the early period of cerebral hypoperfusion in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007;574(1):29-38.
21. Annaházi A, Mracskó E, Süle Z, Karg E, Penke B, Bari F, **Farkas E**. Pre-treatment and post-treatment with alpha-tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2007;571(2-3):120-8.
22. **Farkas E**, Süle Z, Tóth-Szuzi V, Mátyás A, Antal P, Farkas IG, Mihály A, Bari F. Tumor necrosis factor-alpha increases cerebral blood flow and ultrastructural capillary damage through the release of nitric oxide in the rat brain. *Microvasc Res*. 2006;72(3):113-9.
23. **Farkas E**, Institoris A, Domoki F, Mihály A, Bari F. The effect of pre- and posttreatment with diazoxide on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res*. 2006;1087(1):168-74.
24. **Farkas E**, Domoki F, Institoris Á, Annaházi A, Busija DW, Bari F. Neuroprotection by diazoxide in animal models for cerebrovascular disorders. *Vasc Dis Prev*. 2006;3(3):253-264.
25. **Farkas E**, de Vos RA, Donka G, Jansen Steur EN, Mihály A, Luiten PG. Age-related microvascular degeneration in the human cerebral periventricular white matter. *Acta Neuropathol*. 2006;111(2):150-7.
26. Fabene PF, Weiczner R, Marzola P, Nicolato E, Calderan L, Andrioli A, **Farkas E**, Süle Z, Mihály A, Sbarbati A. Structural and functional MRI following 4-aminopyridine-induced seizures: a comparative imaging and anatomical study. *Neurobiol Dis*. 2006;21(1):80-9.
27. **Farkas E**, Timmer NM, Domoki F, Mihály A, Luiten PG, Bari F. Post-ischemic administration of diazoxide attenuates long-term microglial activation in the rat brain after permanent carotid artery occlusion. *Neurosci Lett*. 2005;387(3):168-72.
28. Domoki F, Kis B, Nagy K, **Farkas E**, Busija DW, Bari F. Diazoxide preserves hypercapnia-induced arteriolar vasodilation after global cerebral ischemia in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H368-73.
29. **Farkas E**, Annaházi A, Institoris A, Mihály A, Luiten PG, Bari F. Diazoxide and dimethyl sulphoxide alleviate experimental cerebral hypoperfusion-induced white matter injury in the rat brain. *Neurosci Lett*. 2005;373(3):195-9.
30. Meerlo P, Roman V, **Farkas E**, Keijsers JN, Nyakas C, Luiten PG. Ageing-related decline in adenosine A1 receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study. *J Neurosci Res*. 2004;78(5):742-8.
31. **Farkas E**, Institoris A, Domoki F, Mihály A, Luiten PG, Bari F. Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Res*. 2004;1008(2):252-60.
32. **Farkas E**, Donka G, de Vos RA, Mihály A, Bari F, Luiten PG. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol*. 2004;108(1):57-64.

33. Farkas IG, Czigner A, **Farkas E**, Dobó E, Soós K, Penke B, Endrész V, Mihály A. Beta-amyloid peptide-induced blood-brain barrier disruption facilitates T-cell entry into the rat brain. *Acta Histochem.* 2003;105(2):115-25.
34. de Wilde MC, Hogyes E, Kiliaan AJ, Farkas T, Luiten PG, **Farkas E**. Dietary fatty acids alter blood pressure, behavior and brain membrane composition of hypertensive rats. *Brain Res.* 2003;988(1-2):9-19.
35. **Farkas E**, de Wilde MC, Kiliaan AJ, Luiten PG. Chronic cerebral hypoperfusion-related neuropathologic changes and compromised cognitive status: window of treatment. *Drugs Today (Barc).* 2002;38(5):365-76.
36. **Farkas E**, de Wilde MC, Kiliaan AJ, Luiten PG. Systemic effects of dietary n-3 PUFA supplementation accompany changes of CNS parameters in cerebral hypoperfusion. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;977:77-86.
37. **Farkas E**, de Wilde MC, Kiliaan AJ, Meijer J, Keijsers JN, Luiten PG. Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 2002;954(1):32-41.
38. de Wilde MC, **Farkas E**, Gerrits M, Kiliaan AJ, Luiten PG. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 2002;947(2):166-73.

13.3. A PhD értekezésben szereplő közlemények

1. **Farkas E**, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;64(6):575-611.
2. **Farkas E**, De Jong GI, Apró E, Keuker JI, Luiten PG. Calcium antagonists decrease capillary wall damage in aging hypertensive rat brain. *Neurobiol Aging.* 2001;22(2):299-309.
3. **Farkas E**, De Jong GI, de Vos RA, Jansen Steur EN, Luiten PG. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2000;100(4):395-402.
4. **Farkas E**, De Vos RA, Jansen Steur EN, Luiten PG. Are Alzheimer's disease, hypertension, and cerebrocapillary damage related?. *Neurobiol Aging.* 2000;21(2):235-43.
5. **Farkas E**, De Jong GI, Apró E, De Vos RA, Steur EN, Luiten PG. Similar ultrastructural breakdown of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Ann N Y Acad Sci.* 2000;903:72-82.
6. De Jong GI, **Farkas E**, Stienstra CM, Plass JR, Keijsers JN, de la Torre JC, Luiten PG. Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience.* 1999;91(1):203-10.

13.4. A PhD értekezésben nem szereplő, azt megelőző közlemények

1. **Farkas E**, Jansen AS, Loewy AD. Periaqueductal gray matter input to cardiac-related sympathetic premotor neurons. *Brain Res.* 1998;792(2):179-92.
2. Jansen AS, **Farkas E**, Mac Sams J, Loewy AD. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res.* 1998;784(1-2):329-36.
3. **Farkas E**, Jansen AS, Loewy AD. Periaqueductal gray matter projection to vagal preganglionic neurons and the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1997;764(1-2):257-61.
4. Streefland C, **Farkas E**, Maes FW, Bohus B. C-fos expression in the brainstem after voluntary ingestion of sucrose in the rat. *Neurobiology (Bp).* 1996;4(1-2):85-102.
5. Kedves M, Tóth A, **Farkas E**. An experimental investigation of the biopolymer organization of both recent and fossil sporoderms. *Grana Suppl.* 1993;1:40-48.
6. Kedves M, Tóth A, **Farkas E**. Effect of the high temperature on the morphological characteristic features of the sporomorphs II. *Acta Biol. Szeged.* 1991;37(1-4):25-44.

14. Szcientometriai paraméterek

Farkas Eszter tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2019.03.06)				
Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	66	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	<u>54</u>	<u>1360</u>	<u>1665</u>
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	<u>2</u>	<u>20</u>	<u>20</u>
szakcikk, magyar nyelvű	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	<u>2</u>	<u>34</u>	<u>79</u>
összefoglaló közlemény	---	<u>8</u>	<u>1246</u>	<u>1293</u>
rövid közlemény	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
magyar nyelvű	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	<u>0</u>	---	---
magyar nyelvű	---	<u>0</u>	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	<u>0</u>	---	---
III. Könyvrészlet	3	---	---	---
idegen nyelvű	---	<u>3</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
magyar nyelvű	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
IV. Konferenciaközlemény ⁴	2	---	---	---
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)	72	---	2660	3057
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	72	---	2660	3057
V. További tudományos művek	4	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Oltalmak (szabadalmak)	---	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	0	---	0	0
Összes hivatkozás ¹	---	---	2704	3108
Hirsch index ⁶	30	---	---	---
g index ⁶	55	---	---	---

Speciális szcientometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>22</u>	<u>2027</u>
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>17</u>	<u>182</u>
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2001) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	<u>55</u>	<u>1778</u>
Az utolsó 10 év (2009 - 2019) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	<u>34</u>	<u>601</u>
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	<u>712</u>	22,83%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	<u>1</u>
Jelentés, guideline	<u>0</u>	<u>0</u>
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	<u>0</u>	<u>0</u>

15. Köszönetnyilvánítás

A kutatói pályám alakulásában betöltött meghatározó szerepükért köszönettel tartozom Mentoraimnak:

Hálás vagyok Fekete Éva Professzor Asszonynak, hogy szakdolgozati témát kereső, diákkörös hallgatóként az idegrendszer kutatása felé irányította figyelmemet, és egyedülálló lehetőséget teremtett a pályámat meghatározó első tapasztalatok megszerzéséhez.

Nagy szeretettel gondolok vissza Paul Luiten Professzorra, aki PhD hallgatói ösztöndíjat kínált munkacsoportjában Groningenben, megismertetett az agyi keringés kutatásával, és szülői gondoskodással támogatta szakmai előrehaladásomat.

Köszönöm Tiho Obrenovitch Professzornak, hogy a bradfordi laboratóriumában töltött poszt doktori tanulmányút során bevezetett az optikai képalkotás rejtelseibe, átadta lelkesedését és elhivatottságát a terjedő depolarizációk kutatása iránt, és meghatározó segítséget nyújtott a kísérletes képalkotó laboratórium létrehozásában Szegeden.

Külön köszönöm Bari Ferenc Professzornak, hogy visszatérésemkor Szegedre lehetőséget kínált munkacsoportjában az agyi keringés kutatásának folytatására, folyamatosan újabb célok kitűzésére és elérésére sarkallt, megosztotta szakmai tapasztalatait, kritikus gondolkodásra és különböző perspektívák mérlegelésére tanított, és töretlenül támogatja kutatói pályámat.

Köszönöm minden munkatársamnak, hallgatónak az együttműködést, a közösen elért, szép eredményeket. Nagy örömmel és szeretettel gondolok vissza a közösen eltöltött időre Jian Liu-val, Nico Noormannal, Süle Zoltánnal, és Institóris Ádámmal. Külön köszönöm Menyhárt Ákosnak az inspiráló beszélgetéseket az elmúlt öt évben.

Köszönöm Szüleimnek, hogy a környezetére kíváncsi gyerekként megismerhettem a felfedezés és az alkotás örömét, hogy választott tanulmányaimban és törekvéseimben támogattak. Köszönöm férjemnek, Rajmondnak, és kisfiamnak, Zsigának a feltétel nélküli szeretetüket, a bennünket körülvevő otthont, és hogy mellettem álltak akkor is, amikor a szakmai feladatok teljesítéséhez a nekik járó figyelemből és időből áldoztam.