

MTA Doktori Értekezés Tézisei

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

MTA Doktori Értekezés Tézisei

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. A kutatás háttere	3
1.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció idegéletteni és farmakológiai jellemzői	4
1.2. Az agykérgi terjedő depolarizációval összefüggő metabolikus és hemodinamikai változások, a vérátáramlási változások szabályozása	4
1.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció klinikai jelentősége	5
2. Célkitűzések	5
3. Optikai elven alapuló, kísérletes, agyi képalkotó módszerek kidolgozása az agykérgi terjedő depolarizáció megjelenítésére	6
3.1. Bevezetés és motiváció	6
3.2. Módszerek	6
3.2.1. Feszültségfüggő festéken alapuló fluoreszcens képalkotás <i>in vitro</i> csirke retina preparátumon	6
3.2.2. Multi-modális optikai képalkotás zárt koponyaablak preparátumban altatott patkányban	7
3.2.3. Az optikai képalkotást támogató elektrofiziológiai- és agyi vérátáramlás-mérések	8
3.3. Eredmények, és a kutatás távlatai	9
4. Az iszkémiás agykéregben kialakuló agykérgi terjedő depolarizáció és a csatolt keringési és metabolikus változások jellegzetességei, kórélettani jelentősége	10
4.1. Háttér	10
4.2. Módszerek	11
4.3. Eredmények, a kutatás távlatai	11
4.3.1. Az SD mintázata és az SD-t kísérő hemodinamikai válasz	11
4.3.2. Az SD-vel együttjáró szöveti acidózis	12
5. Az agykérgi terjedő depolarizációhoz csatolt agyi vérátáramlási változás mediátorai, az agyi iszkémia hatása	12
5.1. Háttér	12
5.2. Módszerek	12
5.3. Eredmények, és azok jelentősége	14
5.3.1. Az értágító prosztaglandinok szerepe	14
5.3.2. Az idegszöveti acidózis szerepe	14
5.3.3. Az extracelluláris kálium koncentráció szerepe	15
6. Az életkor hatása az agykérgi terjedő depolarizáció kialakulására, lefutására	16
6.1. Háttér	16
6.2. Módszerek	16
6.3. Eredmények, azok jelentősége	17

6.3.1. Az SD kiválthatósága	17
6.3.2. Az SD-hez társuló CBF változás életkori jellemzői.....	17
6.3.3. Az SD-vel összefüggő szöveti acidózis életkori jellemzői	18
7. Összefoglalás, kutatásaink távlatai.....	18
8. Új megállapítások	22
9. Etikai engedélyek.....	23
10. Támogatók.....	23
11. Irodalomjegyzék	24
12. Közleményjegyzék	30
12.1. A dolgozat alapjául szolgáló, válogatott közlemények	30
12.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények	31
12.3. A PhD értekezésben szereplő közlemények.....	33
12.4. A PhD értekezésben nem szereplő, azt megelőző közlemények	33
13. Szcientometriai paraméterek.....	34
14. Köszönetnyilvánítás.....	35

1. A kutatás háttere

Ma világszerte az akut agysérülések, köztük a stroke következtében történő elhalálozások jelentetik a második leggyakoribb halálokot, míg a tartós egészségkárosodások okai között a zárt koponyasérülés a második, a stroke a harmadik helyen áll. A hazai statisztikai adatok is ezeket a tendenciákat tükrözik.⁴⁸

Az akut neurológiai kórképek kezelése, gyógyítása jelentős kihívás az orvoslás számára, hiszen a betegek ellátására, a hirtelen fellépő sérülés következményeinek mérséklésére többnyire csak órák elteltével nyílik lehetőség. Az iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegeknek jellemzően 8-10 %-a kerül betegellátó intézménybe azon a terápiás időablakon belül (4-6 óra), mely a trombolízises 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 primer léziót gyakran súlyosbítják másodlagos kórfolyamatok (pl. agyödéma, vazospasmus, hypoperfúzió), melyek mérséklése a betegek jelentős hányada esetén a kritikus időablakon túl is reális célkitűzés lehet. Jelenleg azonban a hatékony terápiás lehetőségek száma erősen korlátozott. A másodlagos sérülések kockázatának felismerése fontos cél, hiszen ez alapozhatja meg az eredményes terápiát.

Az elmúlt tizenöt évben meghatározó klinikai megfigyelések születtek arra vonatkozóan, hogy a másodlagos sérülések kialakulásában döntő szerepet játszik az agykérgi terjedő depolarizáció (spreading depolarization, SD).⁵⁹ A közelmúltban olyan vizsgálatok indultak, amelyek az agysérülések kezelésében az SD gátlását hatékony terápiás célpontnak tekintik.^{15,69} Legújabban kezdeményezték az SD-nek mint biomarkernek a monitorozását az idegsebészeti intenzív osztályokon, mert az SD események jellemző mintázata jelzi az agysérülések előrehaladását.^{33,44} A személyre szabott terápiában figyelembe veszik az SD-k előfordulásának mintázatát is.³³

A klinikai vizsgálatok hátterét azok a laboratóriumi vizsgálatok képezik, amelyek bizonyították az SD spontán kialakulását és szövetkárosító hatását az iszkémiás stroke és a zárt koponyasérülés (traumatic brain injury, TBI) kísérletes modelljeiben.^{66,94,109,131} Az 1944-ben, nyulakban felfedezett jelenséget⁷⁸ a sérült emberi agyban ötven évvel később azonosították,⁸⁸ majd 2002-től kezdték szubarachnoideális vérzésen (subarachnoid hemorrhage, SAH) és TBI-n átesett betegek elektrokortikográfiás regisztrátumain módszeresen megfigyelni és jellemezni.^{39,60,128} Az elmúlt tizenöt évben az SD kórélettani jelentősége a szaporodó klinikai eredmények függvényében egyre nagyobb figyelmet és hangsúlyt kapott.^{32,33,59} Az SD az agyi keringési változásokat és az iszkémiás perkondicionálást 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 iszkémiás agykéregben, és milyen hemodinamikai és metabolikus változásokat von maga után a sérült agyban. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy mely vazoaktív mediátorok közvetítik az SD-vel járó hemodinamikai változásokat. Végül kiemelt figyelmet szenteltünk annak, hogy az öregedés, mint az iszkémiás agysérülések nem befolyásolható kockázati faktora, miként módosítja az SD kialakulását, és az SD-vel kapcsolatos szövetkárosító folyamatokat. Az SD és a társuló metabolikus és hemodinamikai változások idő és térbeli jellegzetességeinek megfigyelésére egyedi, optikai elven működő képalkotó rendszert fejlesztettünk ki. Eredményeink, meggyőződésünk szerint, transzlációs lehetőségeket hordoznak magukban, és a párhuzamosan futó klinikai tanulmányokkal összefonódva a klinikumban hasznosulhatnak.

1.1. Az agykérgi terjedő depolarizáció idegéletteni és farmakológiai jellemzői

Az SD az ideg- és gliasajtek egy kritikus tömegének együttes depolarizációja, mely egy pontszerű fókuszról kiindulva, lizenkefál agykéregben koncentrikusan, girenkefál agyban a barázdák mentén terjed tovább.^{78,114,115} A terjedés sebessége jellemzően 2-8 mm/min. Az SD tipikus elektrofiziológiai jellemzője a DC potenciál tranziens, negatív kitérése, mely az agykérgi spontán elektromos aktivitás (ECoG) egyidejű, átmeneti depressziójával jár (i.e. „terjedő depresszió”).⁵³ A negatív DC potenciál-kitérés az idegsejtek potenciáljának a nyugalmi értékről a 0 mV-ot megközelítő eltolódását jelöli, ami mögött az extracelluláris káliumion-koncentráció ($[K^+]_e$) drasztikus emelkedése (3-4 mM-ról 30-60 mM-ra), és ezzel együtt az extracelluláris nátrium- és a kalciumion-koncentráció csökkenése áll (Na^+ : 140-150 mM-ról 50-70 mM-ra; Ca^{2+} : 1-1,5 mM-ról 0,2-0,8 mM-ra).¹⁰¹

Az SD-t iszkémiás körülmények között valószínűleg a magas lokális $[K^+]_e$ idézi elő. Az extracelluláris K^+ felszaporodása az intracelluláris ATP-szint csökkenéséhez köthető, ami az ATP-függő K^+ -csatornák nyitására keresztül egyrészt további K^+ -kiáramlást eredményez,¹²⁹ másrészt a Na^+/K^+ pumpa gátlása révén akadályozza a K^+ visszavételt is.⁵⁷ Emellett azt is megfigyelték, hogy a Na^+/K^+ pumpa ouabainnal történő gátlása SD-t vált ki.⁹ A depolarizáció, mint egy öngerjesztő jelenség, a $[K^+]_e$ és az extracelluláris glutamátszint emelkedése révén, döntően volumentranszmisszióval terjed tovább a szomszédos sejtcsoportokra.^{53,125,137} Az SD-t követő repolarizációban központi szerepet játszik az extracelluláris térben felhalmozódott K^+ visszavételért felelős neuronális Na^+/K^+ pumpa.⁸⁶ Jelentős továbbá az asztrociták részesezése is 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 csatorna.⁷⁹ A glutamát visszavétele feszültség-függő EAAT1 és EAAT2 (excitatory amino acid transporter) típusú glutamát transzporterek révén valósul meg, melyek működése feszültségfüggő, így hatékonyságukat nagymértékben befolyásolják az interstícium ionkoncentrációi.²³ A glutamát felvétele 90 %-ban a többségében az asztrocitákon lévő EAAT2-n keresztül valósul meg.¹⁰⁸

Az SD kialakulásához tehát a $[K^+]_e$ emelkedése kedvező feltételeket teremt. Maga az SD markáns ionáramokkal, az idegszöveti homeosztázis átmeneti felborulásával jár. Az SD terjedését a nagy mennyiségben felszabaduló K^+ és a glutamát közvetíti. Az SD utáni repolarizációban a neuronális K^+ visszavétel mellett az asztrociták K^+ és glutamát felvétele játszik fontos szerepet.

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

Az SD olyan metabolikus kihívást jelent az idegszövet számára, amelyet az SD-hez csatolt, nagymértékű hiperémia sem tud maradéktalanul kielégíteni. A szöveti metabolizmus emelkedését hűen tükrözi, hogy a szöveti pH átmenetileg a fiziológiás 7,35-ről 6,95-re csökken.⁹³ Az acidózis legfontosabb oka a fokozott laktát-termelés,^{93,116} mellyel egyidőben a glükóz koncentrációja jelentősen csökken, és tartósan alacsony marad.^{25,50,91} Végül a glükóz-koncentráció változásának megfelelően az ATP mennyisége is közel felére esik vissza.⁹¹ A bemutatott, SD-re jellemző szöveti metabolikus változások a keringését tekintve ép agykéregben jól reprodukálhatóak, de iszkémia alatt jelentősen módosulhatnak. Ezt a problémakört tárgyalja munkánk 4.3.2. fejezete.

Az SD által támasztott megnövekedett metabolikus igényt a kapcsolódó agyi keringési (cerebral blood flow, CBF) változás hivatott kielégíteni. A hemodinamikai változás lokális, és az SD-vel együtt terjed tovább az agykérgen. Egy adott ponton a CBF változásnak négy, időben egymást követő komponense különböztethető meg.⁷ 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, melyet harminc percnél is tovább elhúzódó oligémia követ.⁷ Ritka eset azonban, hogy az SD-t követő áramlási változásban mind a négy, felsorolt komponens jól elkülöníthető. Az első, hipoperfúziós szakasz a $[K^+]_e$ függvénye, erről részletesen az 5.3.3. fejezetben írunk. A hiperémia mértékét az idegszövet metabolikus állapota befolyásolja, amit a 4.3.1. fejezetben tárgyalt kutatásaink igazolnak. Általánosságban elmondható, hogy a cerebrális iszkémia súlyosbodásával a CBF változásban a

vazokonstriktió dominál, és visszaszorul a hiperémiás komponens.⁶⁵ Ha a hiperémia helyett csak hipoperfúzió alakul ki, inverz csatolásról, illetve terjedő iszkémiáról beszélünk.^{32,34} A hemodinamikai változásokat a választott altatószer is befolyásolja; például patkányban lézer-Doppleres áramlásméréssel izoflurán altatásban nem, míg alfa-kloralóz altatásban egy kései hiperémiás szakasz is kialakul.¹³² Végül a CBF változást záró oligémia jellemzően csak akkor rajzolódik ki, ha az SD kiváltásakor a szöveti perfúzió optimális.

1.3. Az agykérgi terjedő depolarizáció klinikai jelentősége

A klinikai gyakorlatban az SD monitorozása akut agysérülést követően szubdurális elektródasorok invazív, lézióközei felhelyezésével vált lehetővé.^{33,39,45,60,128} A tanulmányokban részt vevő klinikai központokban (<http://www.cosbid.org/about-us/participating-centers/>) ma már rutinszerűen alkalmazzák az elektrokortikográfiás 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 események idő- és térbeli mintázatáról.

Régóta feltételezik, hogy az SD súlyosbítja iszkémiás sérüléseket, és rontja a kimenetelüket.^{59,62} A fokális előagyi iszkémia rágcsló modelljében az infarktus mérete arányosan nő a kialakuló SD-k számával, vagy kumulatív időtartamával.^{29,90} A SAH szövödményeként a betegekben gyakran fellépő másodlagos iszkémiás károsodás (delayed cerebral ischemia, DCI) mértékét, illetve a zárt koponyasérülés (traumatic brain injury, TBI) következményeként kialakuló kérgi lézió progrediálását összefüggésbe hozták az SD előfordulási gyakoriságával és időtartamával.^{39,59,61} A kísérleti bizonyítékok szerint az iszkémiás területtől távolabb kiváltott SD-k ráterjedtek a penumbrára, és kimutathatóan növelték az infarktus méretét.^{14,133}

Az SD-vel összefüggésbe hozható neurodegeneráció hátterében az SD-hez köthető, elégtelen CBF változás állhat³² (részletesen a 4. és a 6 fejezetben mutatjuk be).

Iszkémiás agyszövetben az SD a dendritek duzzadását, és dendrittüske-veszteséget von maga után, ami a szinaptikus kapcsolatok sérülését feltételezi.⁹² Feltételezések szerint az iszkémiás agyszövetben a citotoxikus ödémát az idegszöveti elemek SD-vel összefüggő duzzadása okozza.³⁵ Továbbá, az SD-vel olyan mértékű extracelluláris glutamát koncentráció emelkedés jár együtt, ami excitotoxicitáshoz vezet.^{59,64} Ebben kulcsszerepet tulajdonítanak mind az NMDA receptor aktivációjának, mind a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül bejutó Ca^{2+} -nak.^{106,132}

Megállapítható, hogy az agysérülések szubakut fázisában az SD is felelős az infarktus méretének növekedéséért,^{59,62} a krónikus szakaszban pedig szintén összefüggésbe hozható a másodlagos károsodások több mechanizmusával, és így az SD a szekunder léziók biomarkereként is szolgálhat.^{33,59,142}

2. Célkitűzések

Az elmúlt tíz évben kutatómunkánkat a következő célkitűzések vezérelték:

- 2.1. Kísérletes, optikai elven alapuló képalkotó eljárások kidolgozása az SD és a társuló hemodinamikai és metabolikus változások tér- és időbeli megjelenítésére patkány agykéregben, annak érdekében, hogy
- 2.2. Feltárjuk az SD és a csatolt hemodinamikai valamint metabolikus változások összefüggéseit, és azonosítsuk az SD-vel összefüggő agysérülések egyes mechanizmusait;
- 2.3. Meghatározzuk az SD-hez csatolt vérátáramlási változások mediátorait; valamint
- 2.4. Megismerjük az öregedés hatását az SD kórélettani jellemzőire.

3. Optikai elven alapuló, kísérletes, agyi képalkotó módszerek kidolgozása az agykérgi terjedő depolarizáció megjelenítésére

3.1. Bevezetés és motiváció

Az SD fő ismérve az elektrofiziológiai regisztrátumokon jól felismerhető negatív DC potenciálkitérés. Az SD terjedésére vonatkozóan hagyományosan több pontból történő elvezetéssel nyerhető megbízható információ. A módszer hátránya, hogy az SD terjedésének irányát, illetve iszkémiás szövetben az infarktushoz viszonyított helyzetét nem lehet pontosan meghatározni. Ezért olyan képalkotó módszer kidolgozását tartottuk szükségesnek, amely megbízható információval szolgál az SD terjedéséről, különösen iszkémiás agykéregben.

Az idegszöveti potenciál-változások képi megjelenítésére ígéretesnek tűnt a feszültségfüggő festéken alapuló fluoreszcens képalkotás^{54,55} adaptálása. Gerjesztő megvilágítás mellett, az idegszöveti sejthártyákhoz kötődött feszültségfüggő festék a fluoreszcencia-intenzitás membránpotenciál-változással arányos erősödésével jelzi az idegszöveti aktivitás fokozódását.⁵⁴ Az optikai jel intenzitásváltozása arányos az elektrofiziológiai módszerekkel mért mezőpotenciál-változásokkal. A feszültségfüggő festékek használatának előnye, hogy lehetővé teszi az idegszöveti aktivitás *in vivo*, valós idejű követését nagy térbeli (20-50 μm) és időbeli (milliszekundumos) felbontás mellett.¹⁷ Azért, hogy az SD terjedéséről az iszkémiás agykéregben pontos képet kapjunk, ezt a módszert adaptáltuk az SD megjelenítésére patkány zárt koponyaablak preparátumban.

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 megjelenítése. Képalkotó módszerünket ezért kiegészítettük a CBF monitorozását szolgáló lézer-folt interferencia kontraszt analízissel (laser speckle contrast analysis, LASCA).⁴² Az agyfelszínről visszaverődő fény intenzitása alapján (intrinsic optical signal, IOS) további modalitásokat építettünk képalkotó rendszerünkbe a szöveti térfogat és a vér hemoglobinszaturációjának követésére. Végül annak a kérdésnek 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. Ehhez pH indikátor fluoreszcens neutrálvörös festéket (Neutral Red, NR) használtunk.⁷⁴

3.2. Módszerek

3.2.1. Feszültségfüggő festéken alapuló fluoreszcens képalkotás *in vitro* csirke retina preparátumon

Az optikai képalkotó módszert először *in vitro* csirke retina preparátumon, majd altatott patkány agykérgén állítottuk be. A retina preparátumhoz házi csirkék (Isabrown, 7-28 napos, n=11) bal szemét használtuk. A szemet az egyenlítői síkban átmetsztük, az üvegtestet eltávolítottuk, majd a hátsó féltekét szervkamrába helyeztük. A preparátumon Ringer oldatot áramoltattunk 1 ml/min áramlási sebességgel (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 32 °C-on tartottuk. Az SD-ket 15 percenként 1 μl 0,1 M KCl oldattal váltottuk ki.

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 fényvel világítottuk meg. A visszavert fényt 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) az SD terjedésével párhuzamosan, majd megadtuk a szűrkeszint intenzitásának ROI-ra eső átlagát az idő függvényében.

Az SD-t jelölő mezőpotenciál-változások optikai megjelenítésére fluoreszcens, feszültségfüggő festéket használtunk (RH-1838, Optical Imaging Ltd., Rehovot, Izrael). A szövetet standard Ringer oldatban oldott festékekkel inkubáltuk, majd a festékfelesleget kimostuk. A szövetben felhalmozódott RH-1838-at piros LED fényforrással 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 sztereomikroszkópra erősített (4 × nagyítás; MZ12.5, Leica Microsystems UK Ltd., Milton Keynes, U.K.), felül áteresztő szűrővel ellátott (>670 nm; 695AF55, Omega Optical, Brattleboro, VT. U.S.A.), monokróm CCD kamerával vettük fel (Pantera 1M30, Dalsa, Gröbenzell, Németország). Számítógépes szoftver vezérlésével (ImagePro Plus; Media Cybernetics, U.K.), 2 Hz-es frekvenciával, 500 ms-os expozíciós idők mellett, 3 perc hosszú képsorokat készítettünk. A fluoreszcencia-intenzitás SD-vel összefüggő időbeli változásait az IOS analízishez hasonlóan értékeltük és ábrázoltuk, majd az RH-1838 a felvételi idő alatt lineárisnak mért fakulására korrigáltuk.

3.2.2. Multi-modális optikai képalkotás zárt koponyaablak preparátumban altatott patkányban

Felnőtt, hím Sprague-Dawley vagy Wistar patkányokat 1,5-2,0 % halotánal vagy izofluránnal 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 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.) 37 °C-on tartottuk. 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 megkanüláltuk az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure, MABP) invazív mérése érdekében. Az állatok fejét sztereotaxiás befogóba rögzítettük, majd fogorvosi fúró (Technobox 810, Bien-Air Dental S.A., Bienne, Svájc) segítségével a teljes jobboldali parietális koponyaacsontot eltávolítottuk. A csontperemen zárt koponyaablakot alakítottunk ki: fogászati cementtel megmagasítottuk a csarnok oldalát, amely a mesterséges cerebroszpinális folyadék (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) áramoltatására egy bevezető és egy kivezető polietilén csövet foglalt magában. 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 µl (1 M) KCl oldat kifecskendezése révén SD-k kiváltását szolgálta. 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 buborékoltatva), a kemény agyhártyát 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. A koponyaablakban az aCSF-et folyamatosan, 25 µl/min sebességgel, egy perisztaltikus pumpa (Gilson Minipuls 3, Anachem Ltd., Luton, U.K.) segítségével áramoltattuk.

A mezőpotenciál változásainak optikai megjelenítéséhez aCSF-ben oldott RH-1838 festékoldattal inkubáltuk az agykérget. Az RH-1838 oldatot a koponyaablakban 80 µl/min sebességgel, 2 órán át keringettük, majd a nem kötődő festéket aCSF-el mostuk ki. Az optikai képalkotás követte az *in vitro* csirke retina preparátumnál leírtakat, a következő módosításokkal. A kamerán az RH-1838 emisszió rögzítéséhez sávszűrőt használtunk (3RD 670 740; Omega Optical Inc). A mintavételezési frekvenciát 1 Hz-re csökkentettük. Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának erősítésére a kamera szenzorján 2 × 2

pixelt egybeolvastattunk („binning”). 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 nyers interferenciaképeket egy második CCD kamerával vettük fel, mely műszaki paramétereit tekintve teljesen megegyezett az első kamerával. A két kamerát 1:1 binokuláris fénynyaláb elosztóval erősítettük a sztereomikroszkópra. Mindkét kamerát 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 vezérelte (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.

A CBV 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 a hemoglobin izobesztikus pontjára fókuszáló optikai sávszűrőt (540-550 nm, 3RD540-550, Omega Optical Inc. Brattleboro, VT, U.S.A.) helyeztünk. A visszavert zöld fényt a LASCA-ra használt kamerával 100 ms-os expozíciós idővel rögzítettük. A deoxigenált hemoglobin szöveti meghatározásához a piros fényű LED-et használtuk. Az így keletkező képet az optikai szűrő nélküli kamerával vettük fel másodpercenként 100 ms-os megvilágítási és 10 ms-os expozíciós idő mellett. A szinkronizált fényforrásokkal és kamerákkal a négy modalitásról (RH-1838, LASCA, zöld IOS és piros IOS) másodpercenként egy felvételt készítettünk.

Külön kísérletekben a négy modalitás közül az RH 1838-at fluoreszcens pH indikátor festékkel (Neutral Red, NR, Sigma-Aldrich) helyettesítettük, melyet 30-35 perccel az adatgyűjtés megkezdése előtt, 2×1 ml volumenben, 35 mM koncentrációban, fiziológias sóoldatban oldva, i.p. adagoltunk.⁷⁴ A képalkotás menetét a következők szerint módosítottuk. A kéregben felhalmozódott NR-t sávszűrővel ($\lambda=540-550$ nm) felszerelt, másodpercenként 100 ms hosszan felvillanó, zöld fényű LED-el gerjesztettük felvillanó üzemmódban. A kamera elé az NR emissziós spektrumára optimalizált, 625 nm hullámhosszra centrált, 50 nm sávzélességű optikai szűrőt helyeztünk (XF3413-625QM50; Omega Optical Inc. Brattleboro, VT, U.S.A.). A LASCA áramlási térképek készítéséhez új eszközt, egy 660 nm hullámhosszon világító lézer diódát (120 mW; HL6545MG, Thorlabs Inc., New Jersey, U.S.A.) állítottunk be, amely felvillanó módban másodpercenként 2 ms hosszan világította meg a preparátumot. Az áramlási térképek számításához munkacsoportunk közleményét tekintettünk irányadónak.³¹ Az eszközök összehangolt működését egy LabView környezetben írt, Windows háttéren futó program segítette.

A képsorok analízise az *in vitro* csirke retina preparátumnál leírtak szerint történt. Az NR optikai jelet matematikai módszerekkel korrigáltuk.¹³⁰ A képsorokból intenzitásértékeket tetszőlegesen, manuálisan felhelyezett ROI-k (méret: 9×9 pixel) segítségével olvastunk ki. A választott ROI pozíciója minden egymást követő képen és minden modalításban azonos volt.

3.2.3. Az optikai képalkotást támogató elektrofiziológiai- és agyi vérátáramlás-mérések

A helyi mezőpotenciál elvezetésére (LFP) a retina belső szinaptikus rétegébe üveg kapilláris elektródát szűrtünk ($d=10 \mu\text{m}$). Referenciaként a szervkamra aljába illesztett Ag/AgCl elektróda szolgált. A jelet felerősítettük, DC módban szűrtük (előerősítő: NL 834, további szűrők és erősítők: NL 125, NL 106; Neurolog System, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, U.K.), és analóg-digitális (A/D) átalakítást követően (DASH16, Metrabyte, Keithley Instruments Ltd., Reading, U.K.) számítógépen rögzítettük. Az elektromos jel analízisét ASYST programban (MacMillan Software Co., Keithley Instruments Ltd., U.K.), írt alkalmazással végeztük.

Elektrofiziológiai regisztrátumok elvezetésére aCSF-fel feltöltött üveg kapilláris elektródát ($d=20\ \mu\text{m}$) vezettünk 0,8-1,4 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 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 percének átlagát 100 %-nak, a szívmegeállást követő jelet 0 %-nak (biológiai zéró) tekintettük.

A pH-szenzitív üveg kapilláris elektródákat Voipio és Kalila¹³⁹ szerint készítettük el, majd 0,8-1 mm mélyre ültettük be az agykéregbe. A pH-szenzitív mikroelektróda közvetlen szomszédságába a DC potenciál regisztrálására egy fiziológiás sóoldattal feltöltött üveg kapilláris referencia-elektródát helyeztünk ($d=20\ \mu\text{m}$). Közös referenciaként 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 differenciál erősítővel erősítettük, és négycsatornás analóg izolátoron keresztül (NL 820, NeuroLog System, Digitimer Ltd, U.K.) vezetve tovább szűrtük, digitalizáltuk (analóg-digitális átalakító: MP 150, Biopac Systems, Inc., U.S.A.), 1 kHz-es frekvenciával mintavételeztük, 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 határoztuk meg.

3.3. Eredmények, és a kutatás távlatai

Az SD-ket a retina preparátumon és az agykérgen is az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának tranziens fokozódása jelezte. Összevetettük adott pontban az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitás és a DC potenciál SD-vel összefüggő változásait. A két módszerrel a depolarizáció és a repolarizáció fázisai megközelítőleg azonos módon jeleníthetők meg. Ugyanakkor az SD-t követő hiperpolarizáció maximális relatív kitérése RH-1838 esetén jelentősen meghaladta a DC potenciál elvezetéssel regisztráltat, és időben egyezett az SD-hez társuló hiperémia csúcsával. A hemoglobin nagyon erős fényelnyelő molekula. A szívmegeállással összefüggő SD-t modellező kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a piros IOS intenzitásának csökkenésével párhuzamosan az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitása is mérséklődött a szívmegeállással, a neuronális transzmembrán-potenciáltól függetlenül. Eredményeink analízise során megállapítottuk, hogy a feszültségfüggő festék fluoreszcencia-intenzitását a mezőpotenciál-változásoktól függetlenül gyengítheti a hemoglobin deszaturációja. Az RH-1838 fluoreszcencia-intenzitásának SD-t tükröző változását ezért körültekintően, a hemoglobin szaturációjának figyelembe vételével kellett értékelnünk. Ha az SD áthaladásakor a szöveti mikrokeringésben a hemoglobin szaturációja megközelítőleg változatlan, a fluoreszcencia-intenzitást minimálisan torzítják műtermékek. Komplet keringés leállás esetén az SD kialakulását megelőzi a hemoglobin teljes deszaturációja.³ Az ép keringésű agykéregben is megbízhatóan jelzi az RH-1838 az SD-t, amit alátámaszt, hogy fiziológiás körülmények között, közeli infravörös spektroszkópiai vizsgálatok szerint az SD-vel nem jár hemoglobin deszaturáció. Épp ellenkezőleg, az SD-t követő hiperémia során az oxigénált hemoglobin aránya átmenetileg megemelkedhet.¹⁴⁴ Azonban az iszkémiás penumbra áthaladó SD gyorsan kimeríti a hemoglobin oxigéntartalékait. Ez a festék fluoreszcenciáján egy hirtelen és jelentős intenzitáscsökkenést okoz. A nyilvánvaló műtermékekkel későbbi munkánk során számolnunk kellett.

Azért fontos az SD megfigyelése képalkotó eljárások segítségével, mert így kísérletes modellekben valós időben, két képi dimenzióban megjeleníthetővé válik, terjedésének térbeli tulajdonságai tanulmányozhatóak. A korábban kidolgozott jó térbeli felbontású módszerekkel az SD-hez társuló

áramlási vagy metabolikus válaszokat monitorozták, az SD-t magát nem. A CBF lokális változásainak lézer-folt interferencián alapuló képi megjelenítése jól mutatja az SD áthaladását a kérgi felszínen,^{42,43,77,127} hiszen az SD-t követő CBF változás térben ugyanúgy terjed, mint maga az SD.¹⁰² Hasonlóképpen, az SD-vel járó lokális vérvolumen-változást, illetve az oxigén-felhasználást jelölő hemoglobin-deszaturációt is meg lehet képalkotó eljárásokkal figyelni.^{8,20,43} Az SD követésére a sejtek redox állapotát tükröző, a NADH autofluoreszcenciáján alapuló képalkotó módszert is kidolgoztak.^{89,134,135} A felsorolt módszerekkel a depolarizációt magát nem, csak a vele együtt járó változásokat lehet jó térbeli felbontás mellett követni. Ugyanakkor ismert, hogy a hemodinamikai változók az SD megőrzött kinetikája mellett is nagy variabilitást mutatnak a szövet metabolikus állapotának függvényében.⁷ Az általunk kidolgozott, feszültségfüggő festék fluoreszcenciáján alapuló képalkotó módszerrel közvetlenül az extracelluláris eredetű mezőpotenciál jeleníthető meg.

A feszültségfüggő festéket eddig a látó-, halló- és a szomatoszenzoros kéreg funkcionális szerveződésének feltérképezésére használták.^{21,49,54,96} Szintén sikeresen alkalmazták epilepsziás görcsaktivitás fókuszának azonosítására,^{83,105} és gátló GABA aktivitás keletkezésének és terjedésének követésére.^{18,28} Eredményeink alapján ez az optikai képalkotó eljárás ígéretes az agykérgi iszkémiás sérülések patogenezisének tanulmányozására.

Az agykérgi potenciálváltozások képi megjelenítésén túl sikeresen valósítottuk meg az SD-vel járó szöveti pH változások NR alapú vizualizálását is. Kísérleteink úttörőek abban a tekintetben, hogy pH-szenzitív mikroelektrodával is hitelesítettük képalkotó eljárásunkat, melyet minden korábbi, NR fluoreszcenciát kihasználó vizsgálat nélkülözött.

Az általunk fejlesztett és kialakított multi-modális képalkotó rendszer segítségével a mezőpotenciál- vagy szöveti pH változásokkal szinkronban az agykérgi hemodinamika jellemző paramétereit (a CBF, a CBV és a hemoglobin deszaturációja) is meg tudjuk jeleníteni. Így az agykérgi mezőpotenciál- vagy szöveti pH változásokat és a csatolt hemodinamikai eseményeket megfelelő felbontással, térben és időben egyaránt meg tudjuk egymásnak feleltetni.

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

4.1. Háttér

Kutatómunkánk azokból a megállapításokból indult ki, hogy (i) az SD a fokális agyi iszkémiában spontán, ismétlődő mintázatban alakul ki, (ii) jelzi az idegszövet metabolikus krízisét, (iii) további metabolikus terhet ró az iszkémiának kitétt régióra, rontva ezzel a szövet túlélési esélyeit, és (iv) elővetíti az agyi iszkémia kedvezőtlenebb kimenetelét (1.3. fejezet). Fent bemutatott módszereinkkel arra kerestük a választ, hogy fokális és globális agyi iszkémia során az SD milyen perfúziós viszonyok között alakul ki, milyen mintázatban terjed tova, és milyen metabolikus és véráramlási változások kísérik.

Az ép keringésű patkány agykéregben az SD alatt a szöveti pH átmenetileg 7,35-ről 6,90-6,95-re csökken (1.2. fejezet). A súlyos mértékű acidózis szövetkárosító hatású, mert módosítja az idegsejtek ingerelhetőségét, előmozdítja a szabadgyökök termelődését, gátolja az intracelluláris szignalizációs folyamatokat, és DNS-töredezést indukál.¹²¹ Iszkémiás agyban az SD által okozott pH változás a neuronok sérülése szempontjából meghatározó lehet, ha az rövid időn belül többször ismétlődik, és az SD-vel járó savasodás tovább növeli az iszkémiás penumbrát jellemző pH 6,9 körüli acidózis mértékét.⁸¹ Kísérleteinkben azt kívántuk meghatározni, hogy az SD milyen szöveti pH változásokat von maga után iszkémiás agykéregben.

4.2. Módszerek

A képkészítéshez és az elektrofiziológiai adatgyűjtéshez a 3. fejezetben bemutatott módszereket alkalmaztuk altatott patkányon. Fokális iszkémiát a jobboldali *arteria cerebri media* (MCA) a temporális koponyacsont alatti, disztális szakaszának elzárásával (MCA occlusion, MCAO) hoztunk létre. Multifokális előagyi iszkémiát mikropartikulumok infúziójával indukáltunk (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.;). Előagyi iszkémiát az *arteria carotis communis*-ok kétoldali elzárásával (2VO) hoztunk létre, amit hipovolémiás hipotenzióval súlyosítottunk. A kísérletes iszkémia modellekben az SD-k spontán jelentek meg. Egyes esetekben további SD-eket 1 M KCl topikális rámosásával váltottunk ki.

4.3. Eredmények, a kutatás távlatai

4.3.1. Az SD mintázata és az SD-t kísérő hemodinamikai válasz

Fokális iszkémia kialakulását követően, egy órán belül ismétlődő SD-k alakulnak ki. Az SD-k blokkba csoportosulva, vagy egyenként külön állva jöttek létre. A fokális iszkémia modellekben az SD-k rövid, tranziens depolarizációk voltak, terjedési irányuk és hullámfrontjuk nagy változatosságot mutatott. Globális előagyi iszkémiában elhúzódó vagy terminális SD-eket regisztráltunk, melyek egyenes hullámfronttal, fronto-caudalis irányultsággal haladtak át a látótéren. Az SD-k fokális iszkémia esetén az alapáramláshoz képest 55-60 %-os vérátáramlási értéknél, globális előagyi iszkémiában 40-45 %-os perfúzió mellett, az autoregulációs tartomány elhagyásakor jelentkeztek. Eredményeink alapján a spontán kialakuló SD hipoperfúziós küszöbhez köthető.

Fokális iszkémiában az SD-t kísérő CBF változás az SD fókuszában elhanyagolható mértékűnek bizonyult, lefutása a fókusztól távolodva módosult, egyre nagyobb teret adva a hiperémiás komponensnek. Megmutattuk, hogy az azonos mértékű hiperémiás válaszok esetén a hemoglobin szaturációja változatos dinamikát követ, és a mikroembolizáció által okozott áramlásesés elmélyülésével párhuzamosan, a későbbi SD során a hemoglobin deszaturációja egyre hangsúlyozottabbá válik. Globális előagyi iszkémiában az SD-hez csatolt CBF változást tranziens vagy permanens hipoperfúzió, úgynevezett terjedő iszkémia jellemezte, amelyhez a kritikusan alacsony szöveti perfúzió teremt kedvező feltételeket. Másfelől a terjedő iszkémia tovább fokozza a hipoperfúziót, és növekvő időtartama késlelteti a repolarizációt. A terjedő iszkémiát korábban a szöveti perfúzió fokozatos csökkenésével, és az agykérgi lézió méretének növekedésével a fokális előagyi iszkémia egér modelljében, majd TBI betegekben hozták összefüggésbe.^{63,120} Saját eredményeink és a klinikai tanulmányok arra engednek következtetni, hogy az SD szövetkárosító hatása akkor a legvalószínűbb, amikor az SD-hez terjedő iszkémia társul.^{40,61,63}

A munkánk úttörő jellegűnek számított, hiszen az első olyan tanulmányokat közzöltük, amelyekben térben és időben egyaránt lehetőség nyílt az agyi iszkémia állatmodelljében az SD során az agykérgi mezőpotenciál-változások és a csatolt hemodinamikai események folyamatos követésére. Kutatásaink azzal is újat hoztak, hogy meg tudtuk határozni az SD-k fókuszát, és egy adott esemény terjedésének jellegzetességei a látótér eltérő pontjaiban tetszőlegesen értékelhetővé váltak.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy az ismételten kialakuló SD-k kórélettani szerepet tölthetnek be a kisebb mikroembóliás agyi infarktuszok esetén. Bizonyítottuk, hogy az SD a globális iszkémiás sérülések kórélettani folyamataiban is szerephez jut. Eredményeink hiánypótlóak, hiszen az SD spontán kialakulását eddig csak az iszkémiás vagy traumás agysérülések fokális lézióihoz kötötték. Érdemes tehát fontolóra venni, hogy az SD mennyiben járul hozzá a szisztémás keringés átmeneti megszűnésével, például a szívinfarktussal vagy hirtelen szívmegállással kapcsolatos későbbi neurológiai/pszichiátriai tünetek kialakulásához.

4.3.2. Az SD-vel együttjáró szöveti acidózis

A neuronális aktivitás fokozódása szinte késés nélkül átmeneti szöveti pH csökkenést von maga után, így az idegszövet pH változásait a neuronális metabolizmus érzékeny indikátorának tekintik.²²

Az előagyi iszkémia indukcióját követően a kísérletek egy részében két percen belül spontán SD alakult ki. Az SD a savas szöveti pH viszonyokat jelentős mértékben súlyosbította. Az iszkémiával összefüggő, penumbrára jellemző szöveti acidózist az SD fokozta, és az iszkémiás magra jellemző, erősen savas tartományba tolta el. A spontán SD után tartós, enyhe szöveti acidózis maradt fenn.

Tekintve, hogy (i) az iszkémiás agykéregben az SD-k visszatérő mintázatban ismétlődnek,^{66,94} (ii) az acidózis-indukálta sejtkárosodás küszöbe az acidózis fennállásának hosszával arányosan csökken,⁹⁵ és (iii) eredményeink szerint a szöveti pH az SD után tartósan savas tartományban marad, az SD a szöveti acidózis fenntartása révén is növelheti a neuronkárosodás kockázatát.

Munkánk során először mutattuk meg az SD-hez társuló szöveti acidózis jellemzőit hipoperfundált agykéregben. Rávilágítottunk arra, hogy iszkémia alatt az SD-vel kapcsolatos 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. Eredményeink alapján az extracelluláris tér pufferkapacitásának növelése vagy a laktát hatékonyabb eltávolítása eredményes neuroprotektív stratégiának bizonyulhat.

Iszkémiás sérülések esetén a szöveti pH csökkenése kihasználható a sérült területre korlátozódó gyógyszerhatóanyag-bejuttatásra. Jelenleg futó kísérleteinkben azt vizsgáljuk, 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 régióra leszűkített kezelések révén elkerülhetőek lennének a hatóanyagok nem kívánatos, szisztémás mellékhatásai.

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

5.1. Háttér

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. Az SD terjedése során azonos helyen és egyidőben, nagy mennyiségben szabadulnak fel vazóaktív metabolitok (pl. adenozin, laktát), idegsejtekből kiáramló neurotranszmitterek (pl. glutamát), perivaszkuláris idegvégződésekből származó neuropeptidek (pl. kalcitonin relációs peptid, calcitonin-gene related peptide, CGRP), és a neurovaszkuláris csatolás asztrocitákhoz kötött „klasszikus” mediátorai (pl. prosztanoidok, vagy epoxieikozatriénsavak).⁷ Abban a kérdésben sincs egyetértés, hogy az SD-vel járó hiperémia funkcionális, vagy inkább reaktív jellegű.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, mekkora a részesedése a neurovaszkuláris csatolásban fontos szerepet játszó vazodilatátor prosztanoidoknak (PGs) az SD-t követő hiperémia kialakulásában. 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 ismert, hogy iszkémia során a klasszikus neurovaszkuláris csatolás sérül,⁸⁶ arra is választ kerestünk, hogy az iszkémiás állapot az SD-t követő véráramlási válasz szabályozását miként módosítja.

5.2. Módszerek

Az elektrofiziológiai adatgyűjtéshez a 3. fejezetben bemutatott módszereket alkalmaztuk altatott patkányon. Globális előagyi iszkémiát 2VO-val hoztunk létre. Terjedő depolarizációkat iszkémiás háttéren és kontroll körülmények között 1M KCl topikális alkalmazásával váltottunk ki. A

prostaglandin jelátviteli útvonalak gátlására a következő farmakonokat használtuk: a szelektív COX-2 gátló NS-398-at (100 μ M; Cayman);⁹⁷ a szelektív COX-1 gátló SC-560-at (25 μ M; Cayman);⁹⁸ és az EP₄ antagonistát L161,982-t (1 μ M; Sigma).^{58,73} A szöveti acidózis és az agykérgi vérátáramlás kapcsolatát korrelációs analízissel vizsgáltuk.

Az extracelluláris kálium koncentráció ($[K^+]_e$) szerepét az SD-hez társuló hipoperfúzió létrehozásában fluoreszcens kálium indikátor (Assante Potassium Green-2, APG-2) használatán alapuló két-foton mikroszkópos képalkotással, és kálium-szenzitív elektródák és lézer-Doppleres áramlásmérés együttes alkalmazásával értékeltük. A nagy konduktanciájú, Ca^{2+} -aktivált K^+ (BK) csatornák és az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák (VGCC) lehetséges szerepét a csatornák farmakológiai antagonizálásával teszteltük. Kísérleteinkhez altatott egereket használtunk.

A két-foton mikroszkópos képalkotáshoz zárt koponyaablakot alakítottunk ki (3. fejezet), majd a feltárt agyfelszínre Ringer-HEPES oldatban (150 mM NaCl; 5,2 mM KCl; 2,2 mM $CaCl_2$; 0,2 mM $MgCl_2$; 6 mM $NaHCO_3$; 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.). Az erek egyértelmű azonosítására az agyi érhálózatot rodamin-dextrán (D1841, Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Magyarország; 2-10 mg/100 μ l Ringer-HEPES oldat) retro-orbitális injekciójával töltöttük fel. 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 képalkotási 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 léptékekkel az agyfelszínre merőleges irányban. A kiválasztott keresztmetszeti síkban 1 μ m/pixel térbeli és 0,5-1,25 s (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 az agyfelszínre 1-4 μ l 1 M KCl-ot fecskendeztünk a rögzített üveg kapilláris és a mikrodialízis pumpa segítségével. Az APG-2 és rodamin képsorokat FIJI24-ben automatikus képkiegyenlítés után összevontuk, és RGB színskálára helyeztük át az érátmérők manuális méréséhez.¹¹⁷

Az elektrofiziológiai mérésekhez az ionszelektív elektródákat Viitanen et al.¹³⁸ módszere szerint készítettük. Üveg kapilláris mikroelektródák hegyét ($d=10-12 \mu$ m) ioncserélő folyadékmembránnal (Potassium ionophore I - cocktail A; Sigma), az elektródák nyakát 100 mM KCl-el töltöttük fel.¹¹ A K^+ -szenzitív mikroelektródákat ismert koncentrációjú KCl oldatok segítségével több pontra kalibráltuk (1, 3, 5, 10, 30, 50, 100 mM). A kalibrált K^+ -szenzitív elektródákat mikromanipulátorral az altatott egerek agykérgébe ültettük be, közvetlenül egy 150 nM NaCl-al és 1 mM HEPEST-sel feltöltött referencia-elektroda mellé ($d=20 \mu$ 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.) vezettük át. 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 számítógépen 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, számítottuk ki. A CBF változásait lézer-Doppleres áramlásméréssel regisztráltuk (4.3. fejezet).

Egyes preparátumokat az agyfelszínre mosott BK csatorna blokkoló paxillinnel (aCSF-ben oldva, 500 nM koncentrációban,⁵¹ n=6) vagy L-típusú VGCC gátló nimodipinnel (0,1 % DMSO-t tartalmazó aCSF-ben oldva, 100 µM,¹⁰⁷ n=5) kezeltünk.

5.3. Eredmények, és azok jelentősége

5.3.1. Az értágító proszttaglandinok szerepe

A COX-1 szelektív gátlása, illetve az EP₄ receptor antagonizmusa az iszkémiás patkány agykéregben megnyújtotta az SD hosszát, és késleltette az idegszövet SD-t követő regenerációját. Így elképzelhető, hogy az iszkémia akut szakaszában az SD során a COX-1 útvonalon termelődő PGE₂ aktiválja az EP₄ receptorokat, és elősegíti a repolarizációt. Figyelembe véve, hogy az SD elnyúló időtartama kiterjedtebb iszkémiás sérülést jelez előre,²⁹ az EP₄ receptor aktivációja, így az SD rövidülése segítheti az idegsejtek túlélését. Ezt támasztja alá az is, hogy az EP₄ receptorok genetikai inaktiválása rontja a stroke kimenetelét.² Végül elképzelhető, hogy az iszkémiás infarktus méretének EP₄ receptor agonizmusával elért csökkenéséhez^{1,80} hozzájárul az EP₄ receptorok aktivációja révén az SD rövidülése is.

Intakt kéregben 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. Ugyanakkor az EP₄ receptor blokkoló L161,982 csökkentette a hiperémia amplitúdóját. Az L161,982 továbbá elmélyítette az SD után tartósan fennmaradó oligémiát. Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy az EP₄ receptor szelektív antagonizmusa a CBF változás során egy olyan vazodilatátor komponenst gátolhat, amely mind a hiperémia, mind az oligémia során érvényesült. Eredményeink a proszttaglandinok vazodilatátor szerepét új megvilágításba helyezték, hiszen az SD-t követő hiperémia kialakításában a vazodilatátor prosztanoidok részesedése eddig valószínűtlennek tűnt, illetve a prosztanoid szintézis gátlása potenciózta a hiperémiás reakciót.^{7,76,119}

Az iszkémia során a hiperémia amplitúdója drasztikusan csökkent, melyre az alkalmazott enzimgátlók és az EP₄ receptorblokkoló nem voltak további hatással. Eredményeink indíktat módon igazolni látszanak az agyi érválaszok sérülését iszkémia során.⁶⁸

Munkánkkal elsőként bizonyítottuk, hogy a vazodilatátor proszttaglandinok hozzájárulnak az SD-t követő hiperémia kialakulásához. Igazoltuk, hogy a proszttaglandin szignalizáció csak az ép agykéregben játszik kimutatható szerepet. Bár iszkémiás agysérülések kapcsán régóta ismert a PGE₂ és receptorainak szerepe az idegsejtek túlélésének szabályozásában, eddig ezt nem hozták összefüggésbe az SD-vel. Elsőként mutattuk meg, hogy a COX-1 vagy az EP₄ receptor gátlása az agyi iszkémia korai szakaszában elnyújtja az SD-t, tehát a proszttaglandinok felszabadulása és receptoraik aktiválása elősegíti az SD utáni repolarizációt. Hosszabb távon a proszttaglandin szignalizációs útvonalak azonosított elemei új célpontot jelölhetnek ki az SD-vel összefüggő iszkémiás sérülések mérséklésére.

5.3.2. Az idegszöveti acidózis szerepe

Régóra ismert, hogy a hiperkapnia az agyi erek erőteljes tágulatát okozza, melyet a vér és az agyszöveti pH csökkenésével, hoznak összefüggésbe.⁷⁵ Az extracelluláris pH lokális csökkenése az agykéregben azonban CO₂-tól függetlenül, pl. a laktát felszaporodása révén is értágító hatású lehet.^{4,12,52,145} A 4.3.2. fejezetben bemutattuk, hogy az SD szöveti acidózist indukál, ami a laktát felhalmozódásával függ össze.^{93,116} Kísérleteink lehetőséget biztosítottak arra, hogy részletesen megvizsgáljuk az SD és a következményes szöveti acidózis pontos összefüggéseit.

Kísérleti eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a sértetlen agykéregben szoros pozitív korrelációt mutat az SD-vel a DC potenciál-kitérése és az acidózis mértéke. 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.^{22,85} 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 kapcsolatot mutat, igazolódni látszik, hogy az SD-t kísérő CBF változás szabályozásában a szöveti acidózis is szerepet játszik.

Iszkémia alatt – a sértetlen kéregtől eltérően – az SD-vel járó hiperémia amplitúdója nem korrelált a DC potenciál kitérés vagy az acidózis mértékével. Ugyanakkor az iszkémia nem befolyásolta az SD-t jelölő DC potenciál kitérés és az acidózis amplitúdója közötti kapcsolatot. Bár a hiperémiát tükröző görbe amplitúdója aránytalanul alacsonyabbnak bizonyult iszkémia alatt, időtartama az SD és az acidózis hosszának függvényében alakult. Az SD utáni repolarizáció, illetve a neuronális aktivitás visszatérésének késése azt tükrözi, hogy az energiaigényes Na^+/K^+ -pumpa ATP hiányában nem képes a nyugalmi membránpotenciál helyreállítására,³² az elhúzódó energiaigény lehet felelős a hiperémia huzamosabb fenntartásáért.

Legfontosabb megállapításunknak azt tartjuk, 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 hipotézisünket, amely szerint az SD-hez csatol CBF változás kialakulásában szerepet játszó mediátorok meghatározó mértékben tartalmaznak metabolikus komponenseket (például a szöveti pH változása). Munkánk továbbá rávilágít arra, hogy iszkémiás állapotokban a metabo-vaszkuláris csatolás egyensúlya felborul, és az érválaszok nem képesek követni a szövet metabolikus igényeinek növekedését.

5.3.3. Az extracelluláris kálium koncentráció szerepe

A fokozott neuronális aktivitás során felhalmozódó extracelluláris kálium nagyon hatékonyan szabályozza az érátmérőt. Koncentráció-függő módon, 20 mM alatt tágítja, 20 mM felett összehúzza az ereket.⁷² Az SD során az idegszövet extracelluláris kálium koncentrációja ($[\text{K}^+]_e$) több, mint tízszeresére, a 3-4 mM-os nyugalmi alapértékről akár 30-60 mM-ra is emelkedhet.^{7,124} 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,⁷ nincs kísérletes bizonyíték arra, hogy a korai vazokonstriktió közvetlenül a magas $[\text{K}^+]_e$ -nak tulajdonítható.

A K^+ bonyolult jelátviteli utakon keresztül éri el vazóaktív hatását. Az extracelluláris térben felhalmozódó, felesleges K^+ -ot az asztrociták veszik fel, valószínűleg Kir4.1-es kálium csatornákon keresztül,⁷⁰ majd a K^+ -ot részben a végtalpaikon elhelyezkedő nagy konduktanciájú, Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornákon (BK csatorna) át ürítik a perivaszkuláris térbe.⁵¹ A perivaszkuláris $[\text{K}^+]$ 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 vazokonstriktiót eredményez.⁷¹ Kísérleteink célja az volt, hogy bizonyítsuk a K^+ meghatározó szerepét az SD-hez kapcsolódó korai vazokonstriktió létrejöttében, és hogy meghatározzuk az asztrociták végtalpain elhelyezkedő BK csatornák, valamint az érsimaizmon elhelyezkedő VGCC-k részesedését a hipoperfúzió kialakulásában.

A két-foton mikroszkópos vizsgálatok szerint az agykérgi piális és penetráló arteriolák konstriktiója térben és időben pontosan akkor jelentkezett, amikor az $[\text{K}^+]_e$ -al arányos APG-2 jelintenzitás-növekedés egy adott ér közvetlen szomszédságába ért, ami szoros csatolást feltételez. Az SD-hez kapcsolódó CBF változás kezdeti hipoperfúziós komponensét a BK csatorna blokkoló paxillin és az L-típusú VGCC-t antagonistázó nimodipin jelentősen gátolta. Különösen a paxillin bizonyult hatékonynak, hiszen a vizsgált 7-ből 6 esetben nem alakult ki a kezdeti hipoperfúzió. Bár a nimodipin hatása nem volt ennyire szembetűnő, a hipoperfúzió mértékét a nimodipin is a kontroll érték felére csökkentette.

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,⁷ azt nem hozták összefüggésbe meghatározott ioncsatornák működésével.³⁴ Eredményeink szerint az SD során az érátmérő-szabályozásában a 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 vezettünk be altatott egéren, amely lehetőséget teremt a $[K^+]_e$ és az értónus közötti kapcsolat térbeli és időbeli, részletes, és pontos feltérképezéséhez.

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

6.1. Háttér

Egyre több bizonyíték szerint az SD közrejátsszik az akut agysérüléseket követő másodlagos károsodások létrejöttében. Ezért fontos feltárni az SD kialakulásának kedvező körülményeket. Az életkor nem befolyásolható rizikófaktora azoknak a neurológiai kórképeknek, amelyekben az SD-t kórélettani tényezőnek tekintik (pl. TBI, SAH, iszkémiás stroke). A TBI előfordulása leggyakoribb gyermekkorban (esések), fiatal felnőtt korban (balesetek), és idős korban (esések).¹³ A SAH ugyanakkor a vérzéses stroke leggyakoribb formája fiatal felnőttekben, és a fiatal életkor a kései vazospasmus és a gyakori szövődeményként fellépő DCI rizikófaktora.^{16,24,27,84,104} Az iszkémiás stroke leginkább az idős korosztályt sújtja, hiszen előfordulási gyakorisága 50 év felett ötévente megduplázódik, és a sikeres felépülés esélye is egyre csekélyebb.^{19,82} Az idős agyban továbbá az iszkémiás penumbra gyorsabban válik a menthetetlen infarktus részévé.⁵

Annak ellenére, hogy az iszkémiás stroke gyakrabban fordul elő és súlyosabb kimenetelű az idősokban, 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 öregeken, 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 hatékonyan 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.

6.2. Módszerek

Az életkori sajátosságok felmérésére patkányok fiatal felnőtt (6-30 hetes), középkorú (9-10 hónapos), és idős (18-24 hónapos) csoportjainak eredményeit vetettük össze. Az elektrofiziológiai mérések és az optikai képalkotás a 3. fejezetben bemutatott módszerek szerint történt. Egyes kísérleti csoportokban disztális MCAO és egyoldali *arteria carotis communis* elzárással fokális iszkémiát, illetve 2VO-val globális előagyi iszkémiát hoztunk létre.

Az SD-k elektromos kiválthatósági küszöbének meghatározásához egy koncentrikus, bipoláris tűelektrodát (méret: 40 μ m, Neuronelektrod Kft., Magyarország) érintettünk a *dura* felszínéhez. Az elektrodát egyenáram-kimenetű opto-elektronikus izolátorral (NL 800, Digitimer Ltd, Egyesült Királyság), pulzusgenerátorral (NL301), szélesség-késleltető panellel (NL405), és impulzus pufferrel (NL510) kötöttük össze, 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.

A CBF változásokat és a feszültségfüggő festék fluoreszcenciáját teljes-kép analízissel is értékeltük. A látótér szélén a koponyacsontot és a kérgi felszínen kirajzolódó piális érhalózatot maszkkal kítakartuk. A CBF térképeken 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.

6.3. Eredmények, azok jelentősége

6.3.1. Az SD kiválthatósága

Az SD kémiai kiváltásával kapcsolatos kísérleteink azt mutatták, hogy az öregedő patkányagyban az SD kialakulásához magasabb K^+ koncentráció szükséges, az SD események ismétlődésének frekvenciája csökken, és alacsonyabb annak a valószínűsége is, hogy az iszkémiára válaszul spontán SD alakuljon ki. Az SD elektromos kiválthatósági küszöbe hasonlóképp változott az életkorral. Az életkor előrehaladtával egyre nagyobb töltésmennyiségre volt szükség mind a sértetlen, és mind az iszkémiás patkány agykéregben is ahhoz, hogy az SD kialakuljon.

Eredményeink szerint az életkorral együtt az SD jellemzői is változnak. Az iszkémia indukciójára válaszul kialakuló SD-k az idős állatokban nagyobb valószínűséggel voltak terminális események, mint a fiatalokban. Nőtt a terminális SD-ben érintett kérgi terület is. Ezzel szemben fiatal és a középkorú állatokban az SD-t jellemzően repolarizáció követte.

Az öregedés és az SD kölcsönhatását célzó kutatásaink során bizonyítottuk, hogy bár az SD-k előfordulása az idős agyban kevésbé valószínű, a megjelenő események mégis súlyosabb következményekkel járnak. Ezt jelzi elektrofiziológiai megközelítésben a repolarizáció késlekedése, vagy teljes elmaradása, valamint a 6.3.2. fejezetben bemutatásra kerülő agyi keringési változások. Az SD-k kiválthatóságának életkorfüggő csökkenése az idegszövet ingerelhetőségének gyengülésével, vagy az egyes SD-k utáni regeneráció idejének megnyúlásával hozható összefüggésbe.

Munkánk hiánypótló, és új ismeretekkel bővítette az SD-re vonatkozó szakirodalmat. A fiatal felnőtt és középkorra koncentrált vizsgálataink 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 ideglettani 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.¹²³ Eredményeink olyan szempontból is jelentősek, hogy a TBI, melyben az SD-k kórélettani szerepe mára vitathatatlan,^{60,63,87,136} serdülő és fiatal felnőtt korban fordul elő nagy gyakorisággal.¹³

6.3.2. Az SD-hez társuló CBF változás életkori jellemzői

Az SD-t követő CBF változások jellemzőit fiatal, középkorú és idős korcsoportokban tanulmányoztuk. Sértetlen illetve iszkémiás patkány agykéregben az SD-vel kapcsolatos CBF változásban nem tapasztaltunk életkorral összefüggő különbséget. Azonban az idős korcsoportban fiziológias körülmények között nagyobb gyakorisággal fordult elő az SD-hez kapcsolódó kezdeti hipoperfúzió. Iszkémia során az idős csoportban az SD-hez társuló hiperémia mértéke kisebbnek bizonyult, és szembeötlően gyakori volt a terjedő iszkémia jelensége. A terjedő iszkémia következményeként ismertük fel, hogy az érelzáródással létrehozott hipoperfúzió az elvárható kompenzáció helyett az idő múlásával tovább súlyosbodott, és a kritikusan alacsony vérellátású kérgi terület kiterjedése is nőtt. Új eredményeinket összefoglalva (i) az idős agyban gyakrabban jelentkeznek

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. Valószínű, hogy a bemutatott vazokonstriktív irányba tolódó áramlási válaszok az iszkémia során súlyosbítják az idegszövet vérellátásának elégtelenségét, így jelentősen hozzájárulnak az iszkémiás infarktus idős agyra jellemző, fokozott növekedéséhez.^{5,103} Végül az áramlási válaszok elégtelensége adhat magyarázatot arra, hogy bár az idős agyban kisebb az SD kialakulásának valószínűsége (6.3.1. fejezet), az SD-vel kapcsolatos sérülés kockázata mégis magasabb, mint fiatal korban.

6.3.3. Az SD-vel összefüggő szöveti acidózis életkori jellemzői

A 4.3.2. fejezetben bemutattuk, hogy az SD számottevő szöveti acidózissal jár. Az életkori tényezőt vizsgáló kísérleteink szerint az öregedés optimális kérgi perfúzió mellett nem befolyásolta az SD-vel járó acidózis hosszát iszkémiás körülmények között azonban az idős agyban az acidózis jelentősen hosszabb ideig maradt fenn. A szöveti pH rendeződésének hatékonyságát az acidózis csúcspontját követő visszatérés rátájával jellemeztük. A visszatérés sebessége az idős állatokban mind intakt, mind iszkémiás kondíció mellett jellegzetesen csökkent. Az SD után enyhe fokú szöveti acidózis marad vissza, amely az idős állatokban jelentősebbnek bizonyult, mint a fiatalokban.

A szöveti acidózis és az SD kapcsolatát tovább elemezve azt tapasztaltuk, hogy fiatal állatokban a depolarizáció és a szöveti acidózis hossza egymással szorosan összefügg. Az idős állatokban azonban az acidózis időtartama függetlenné vált a depolarizáció és az SD-vel összefüggő hiperémia hosszától. Míg a fiatal állatokban az acidózis hossza 40 %-kal haladta meg az SD hosszát, az idős csoportban az acidózis időtartama majdnem megduplázódott az SD hosszához képest. Feltűnő életkorbeli különbségnek adódott az is, hogy míg a fiatal állatok esetén a hiperémia hossza arányában túlnyúlt az acidózis időtartamán, addig az idős csoportban az acidózis bizonyult hosszabbnak.

A korrelációs vizsgálatok eredményeiből arra következtetünk, hogy az idős agyban az SD által okozott acidózisból késlekedik a visszatérés. Az SD-vel járó acidózis hátterében a laktát felhalmozódása jár,^{93,116,118} amit az idős agyban a korlátozott laktát-eltávolítás okozhat. A laktátot a cerebrovaszkuláris endothélszöveteken elhelyezkedő monokarboxilát-transzporter-1 (MCT1) facilitált diffúzióval juttatja az interstíciumból a véráramba.¹⁰⁰ Egy régi tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy iszkémiás stroke esetén az MCT1 diszfunkciója hozzájárulhat az acidózis által okozott neurodegenerációhoz.⁴¹ A fejlődő agyban az MCT1 kifejeződése erősen életkorfüggőnek bizonyult.⁹⁹ 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 lehet.

Munkánk során rávilágítottunk arra, hogy az idős agyban SD-t követően a szöveti pH rendeződése késlekedik. 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.

7. Összefoglalás, kutatásaink távlatai

A dolgozatban az elmúlt tíz év SD-re koncentrált kutatómunkájának eredményeit mutatjuk be tematikus rendben. Kísérleteink kiindulópontja az volt, hogy megállapítsuk, fokális iszkémia esetén az iszkémiás maghoz viszonyítva hol keletkezik SD. Továbbá arra voltunk kíváncsiak, hogy az SD miként járul hozzá az iszkémiás lézió további kiterjedéséhez. A megfogalmazott célkitűzések eléréséhez

egyedi, nagy látószögű, képalkotó rendszert alakítottunk ki, mely lehetővé tette az SD-vel összefüggő idegéletani jelenségek térbeli jellegzetességeinek megfigyelését (3. fejezet). A képalkotó eljárás több lépcsős fejlesztésével célunk volt az SD minél több jellemzőjének egyidejű megjelenítése. Feszültségfüggő festék használatával elsőként tettük láthatóvá az agykérgi depolarizációt és annak dinamikus változását. 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. Előrelépést jelent a két- vagy multi-foton mikroszkópia, mely a kéreg mélyebb rétegeibe is betekintést enged, és nagy felbontása révén kedvez a sejtszintű szabályozó mechanizmusok tanulmányozásának (5.3.3. fejezet).

Eredeti megfigyeléseink, hogy az SD kialakulásához a penumbra jellemző áramlási küszöb rendelhető (4.3.1. fejezet), és hogy fokális iszkémia során az SD a penumbra régióban jön létre, majd onnan terjed tovább. Eredményeinket megerősítették további kutatások, illetve kiegészítették azzal, hogy az SD kialakulásához a szövet fokozott lokális oxigén-felhasználása, valamint hipotenziós tranziensek teremtenek kedvező feltételeket.¹⁴⁰ Ezzel összhangban áll az a megfigyelésünk, hogy előagyi iszkémia modellünkben az SD az iszkémiát súlyosbító hipovolémiás hipotenzio során, az autoregulációs tartomány elhagyásakor jelent meg (4.3.1. fejezet). Az autoregulációs sáv elhagyásakor keletkező SD-khez kísérleteinkben rendszerint terjedő iszkémia társult (4.3.1. fejezet), ami alapján az autoregulációs diszfunkció 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.^{63,136} A terjedő iszkémia ugyanakkor az SD-vel összefüggésben kialakuló szövetkárosodás közvetítőjeként, kulcsszereplőjeként ismert, hiszen a metabolikus krízis elmélyítése révén késlelteti az SD utáni repolarizációt.³² A repolarizáció késése, a hosszan elhúzódó depolarizáció pedig egyrészt hozzájárul a másodlagos sérülések kialakulásához, másrészt a neurodegeneráció és a neurológiai károsodás súlyosbodását jelzi.^{39,59}

Mivel a terjedő iszkémia késlelteti a repolarizációt, globális iszkémia modelljeinkben (hipovolémiás hipotenzioval súlyosbított előagyi iszkémia, ill. szív megállás) a spontán jelentkező depolarizáció hosszan elnyúló illetve terminális anoxiás depolarizáció volt (4.3.1. fejezet). Kísérleteink alapozták meg azt a mára már általánosan elfogadott véleményt, hogy az anoxiás depolarizáció (AD) az SD-hez hasonlóan terjed. Így a korábban külön jelenségekként számon tartott AD, peri-infarktus depolarizáció, iszkémiás depolarizáció és SD ugyanazon idegéletani illetve kórfolyamat manifesztációja egy jól meghatározható súlyossági spektrum mentén.^{38,59} Munkánk jelentősen befolyásolták az AD további jellemzőinek tanulmányozását.⁵⁹ 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.^{6,36}

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 (5. fejezet). Munkánk során megállapítottuk, hogy a szöveti acidózis, mely SD során meghatározó részben a laktát felszaporodásának köszönhető,^{93,116} hozzájárul az SD-t követő hiperémia szabályozásához (5.3.2. fejezet). Az anaerob metabolizmus során keletkező laktát értónusszabályozó tulajdonságáról is ismert.⁴ Érdekes összefüggés, hogy az extracelluláris K⁺ felhalmozódása (mely az SD egyik legismertebb jellemzője) elősegíti a laktát felszabadulását,^{4,126} ami a vazodilatátor PGE₂ visszavételéért felelős prosztaglandin-transzporter gátlásához vezet.⁵² A folyamat eredménye, hogy a PGE₂ tartósabban fejtheti ki értágító hatását.

A PGE₂ termelésében részt vevő enzimek és a PGE₂ EP₄ receptorának farmakológiai gátlása révén sikerült bizonyítanunk, hogy a vazodilatáció PGE₂ útvonala jelentősen hozzájárul az SD-hez kapcsolódó hiperémia kialakulásához (5.3.1. fejezet). Az ép agykéregben azonosított szabályozási folyamat

azonban iszkémia során nem jut érvényre (5.3.1. fejezet). Talán épp az értágító folyamatok háttérbe szorulása emeli ki iszkémiás agyban az SD-t követő CBF változás vazokonstriktív komponenseit, és magát a terjedő iszkiémiát.^{10,30}

A vazokonstriktív aktív útvonalának tekintettük a $[K^+]_e$ SD-vel összefüggő drasztikus emelkedését (i.e. > 20 mM). Bizonyítottuk, 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 (5.3.3. fejezet). A kutatás azt is igazolta, hogy a magas $[K^+]_e$ által okozott vazokonstriktív részben a cerebrovaszkuláris simaizomsejtek L-típusú VGCC-in, az intracelluláris kalciumszint emelkedésén keresztül valósul meg (5.3.3. fejezet). Ezt támasztják alá legfrissebb eredményeink is, melyek szerint az L-típusú VGCC-k gátlása fokozza a CBF változás hiperémiás komponensét.¹³² 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,^{51,71} másrészt Kir4.1 csatornák révén valósul meg a K^+ pufferelése.^{67,70}

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,^{26,46,47,56,122} azonban az időskori elváltozásokat, vagy azok átfedését az iszkiémiával nem vizsgálták. Munkánk ebből a szempontból a mai napig egyedülálló a tématerületen. Többszörösen bizonyítottuk, hogy az SD kiválthatósága fiatal felnőttkorától az időskorig fokozatosan csökken (6.3.1. fejezet). Ugyanakkor megállapítottuk, hogy az idős sérült agyban kialakuló SD után a repolarizáció késik, az SD szövetkárosító hatása hangsúlyozottabbá válik (6.3.1. fejezet). Eredményeink szerint az idős agyban az SD kisebb valószínűséggel jelenik meg, mint a fiatalban, terjedése mégis nagyobb metabolikus terhet ró az idegszövetre, és az iszkiémiás 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. Ugyanakkor a terjedő iszkiémia kialakulásának esélye a kor előrehaladtával szembetűnően megnő (6.3.2. fejezet). Valószínűleg ez az oka annak is, hogy az idős agyban az iszkiémiára válaszul működésbe lépő CBF kompenzáció nem kielégítő; az áramlás részleges javulása helyett további fokozatos áramlás-csökkenés tapasztalható.

Kíváncsiak voltunk arra is, 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 képest, de az idős iszkiémiás 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 (6.3.3. fejezet). Az acidózis időtartamát az idős agyban továbbá nem követte a hiperémia hossza, a két változó közötti összefüggés megbomlott (6.3.3. fejezet). A szöveti acidózis vizsgálatával gyűjtött tapasztalataink alapján született az elképzelés, hogy a szöveti pH csökkenését a sérült területre korlátozódó gyógyszerhatóanyag-bejuttatásra használjuk ki iszkiémiás sérülések esetén. Jelenlegi kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy savas pH-ra nyíló, értágító nimodipint (5.3.3. fejezet) szállító nanopartikulumok milyen hatékonysággal adják le a hatóanyagot és ezen az úton elérhető-e védő hatás az agyi iszkiémia állapotmodelljében. A szöveti pH alapján, az iszkiémiás szövetregióra leszűkített kezelések révén elkerülhetőek lennének a hatóanyagok nem kívánatos, szisztémás mellékhatásai.

Az orvos-biológiai alap kutatások sarkalatos pontja a transzlációs potenciál. Ez igaz a különböző emlősökön, első sorban rágcsálókön végzett SD vizsgálatok esetén is. Azóta, hogy közvetlen bizonyítékok szerint az SD kialakul akut agysérülést elszenvedett betegek agykérgében,^{88,128} szerepének tisztázása egyre nagyobb figyelmet kap a másodlagos sérülések súlyosbodásában.^{32,59} A

kórfolyamatok megismerése révén elérhető céllá vált az SD kialakulásának gátlása és a csatolt hemodinamikai válasz kedvező irányú befolyásolása.¹¹³ A bemutatott és folyamatban lévő kutatásaink ezekbe az irányokba tettek, tesznek lényeges előrelépéseket.

Hetvenöt évvel az SD felfedezése⁷⁸ után 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.^{37,45,60,61,128} 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.^{39,60,143} Megállapították, hogy az SD ismétlődő előfordulása az elsődleges sérülés rosszabb kimenetelét vetíti előre.^{32,39,63} Felismerték, hogy az SD meghatározott körülmények között agyi vazokonstriktiót, áramlásesést vált ki^{34,63,143} (5.3. fejezet). Igazolták, hogy az SD progresszív, metabolikus okokra visszavezethető funkcionális károsodást okoz³⁹ (5. fejezet). Megfigyelték, hogy az SD lefutása farmakológia úton modulálható, így az SD gátlása neuroprotektív terápiák célpontjaként jelölhető meg^{15,106,107,110,112,114,132,141} (6.3. fejezet). Végül felvetették annak a lehetőségét, hogy az SD monitorozását diagnosztikai eszközként használják az idegsebészeti intenzív osztályokon.^{32,33} Meghatározó megfigyeléseink összhangban vannak a klinikai kutatásokkal és kétséget kizáróan tanúsítják az SD kutatásának létjogosultságát.

8. Új megállapítások

- 9.1. Bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy agyi iszkémia során az SD-hez kóros CBF reakció társul, és 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 egyes neurodegeneratív kórfolyamatokban.
- 9.2. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az SD és az AD egyazon idegéletteni jelenség eltérő kifejeződése. Bizonyítottuk, hogy a terminális AD – az SD-hez hasonlóan – terjed. Eredményeink megalapozták azt a nézetet, mely szerint a korábban külön jelenségekként számon tartott AD, peri-infarktus depolarizáció, iszkémiás depolarizáció valamint SD ugyanazon idegéletteni folyamat manifesztációja egy jól meghatározható spektrum mentén. Bemutattuk, hogy az SD/AD szerepet játszik az előagyi iszkémiás sérülések kórelletteni 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 PGE₂/EP₄ útvonalnak. Kimutattuk, hogy iszkémiás körülmények között ez a szignalizáció károsodik. Megmutattuk, hogy ép agykéregben az SD-hez társuló korai érösszehúzódás az extracelluláris K⁺ felhalmozódásának következménye. A folyamatban meghatározó szerepe van a BK csatornák és az L-típusú VGCC-k aktivációjának. További bizonyítékokat szolgáltatunk arra 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, súlyosbodik az SD-hez köthető metabolikus krízis. Rávilágítottunk arra, hogy az idős agyban az SD erőteljesebb szövetkárosító hatása mögött SD-hez társuló elégtelen CBF változás állhat; az idős agyban jelentősen megnő a terjedő iszkémia kialakulásának valószínűsége. Rámutattunk, hogy az idős agyban SD-t követően késlekedik a szöveti pH helyreállása.
- 9.5. Kutatási céljaink szolgálatában létrehoztunk egy egyedi, multi-modális, optikai elven működő, képkövető rendszert, amelyet az elmúlt évek során kísérleti céljaink érdekében sokrétűen fejlesztettünk. Módszereink alkalmasak az agykérgi mezőpotenciál, a szöveti 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 tetszőleges pontjain.

9. 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.

10. 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.

11. Irodalomjegyzék

1. 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.
2. Andreasson K. Emerging roles of PGE₂ receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010;91(3-4):104-12.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev*. 2015;95(3):953-93.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Bazzigaluppi P, Dufour S, Carlen PL. Wide field fluorescent imaging of extracellular spatiotemporal potassium dynamics in vivo. *Neuroimage*. 2015;104:110-6.
12. 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.
13. Bruns J Jr, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*. 2003;44(s10):2-10.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Chemla S, Chavane F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. *J Physiol Paris*. 2010 Jan;104(1-2):40-50.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Chesler M, Kaila K. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci*. 1992;15(10):396-402.
23. 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.
24. Crobeddu E, Mittal MK, Dupont S, Wijdicks EF, Lanzino G, Rabinstein AA. Predicting the lack of development of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2012;43(3):697-701.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. DeFazio RA, Hablitz JJ. Horizontal spread of activity in neocortical inhibitory networks. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;157(1):83-92.
29. 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.
30. Domoki F, Nagy K, Temesvári P, Bari F. Selective inhibitors differentially affect cyclooxygenase-dependent pial arteriolar responses in newborn pigs. *Pediatr Res*. 2005;57(6):853-7.
31. 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.
32. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*. 2011;17(4):439-47.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolia 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.
38. Dreier JP, Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron*. 2015;86(4):902-922.
39. 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.
40. Drenckhahn C, Winkler MK, Major S, Scheel M, Kang EJ, Pinczolis 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

46. 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.
47. 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.
48. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017 Feb 3;120(3):439-448.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Grafstein, B. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*. 1956;19(2):154-71.
54. Grinvald A, Hildesheim R. VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):874-85.
55. 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.
56. Guedes RC, Amorim LF, Teodósio NR. Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(10):1407-12.
57. 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.
58. 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.
59. 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-Porras 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.
60. 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.
61. 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.
62. Heiss WD. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1268:26-34.
63. 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.
64. 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.
65. Hoffmann U, Ayata C. Neurovascular coupling during spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl*. 2013;115:161-5.
66. Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1996;8(3):195-208.
67. Imbrici P, Camerino DC, Tricarico D. Major channels involved in neuropsychiatric disorders and therapeutic perspectives. *Front Genet*. 2013;4:76.
68. Jackman K, Iadecola C. Neurovascular regulation in the ischemic brain. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(2):149-160.
69. 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.
70. Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. 2004;129(4):1045-1056.
71. 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.
72. 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.
73. 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.

74. 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.
75. Lassen NA. Brain extracellular pH: the main factor controlling cerebral blood flow. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;22(4):247-251.
76. 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.
77. Lauritzen M, Fabricius M. Real time laser-Doppler perfusion imaging of cortical spreading depression in rat neocortex. *Neuroreport.* 1995;6(9):1271-1273.
78. Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7: 359-390.
79. Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia.* 2005;50(4):407-416.
80. 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.
81. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1431-1568.
82. Liu F, McCullough LD. Interactions between age, sex, and hormones in experimental ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2012;61(8):1255-1265.
83. Ma HT, Wu CH, Wu JY. Initiation of spontaneous epileptiform events in the rat neocortex in vivo. *J Neurophysiol.* 2004;91(2):934-945.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Mayevsky A, Weiss HR. Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11(5):829-836.
90. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport.* 1993;4(6):709-11.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. Nedergaard M. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol.* 1996;71:75-83; discussion 83-84.
95. Nedergaard M, Goldman SA, Desai S, Pulsinelli WA. Acid-induced death in neurons and glia. *J Neurosci.* 1991;11(8):2489-2497.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 2005;94(1):1-14.

101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Reinhart KM, Shuttleworth CW. Ketamine reduces deleterious consequences of spreading depolarizations. *Exp Neurol.* 2018;305:121-128.
107. 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.
108. Rimmele TS, Rosenberg PA. LT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2016 Sep;98:19-28.
109. 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.
110. 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.
111. Sánchez-Porras 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.
112. Sánchez-Porras 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.
113. Sánchez-Porras R, Zheng Z, Sakowitz OW. Pharmacological modulation of spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl.* 2015;120:153-7.
114. 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.
115. 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.
116. Scheller D, Kolb J, Tegtmeyer 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. Siesjö BK, Katsura KI, Kristián T, Li PA, Siesjö P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;66:8-14.
122. 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.
123. Somerville LH. Searching for Signatures of Brain Maturity: What Are We Searching For? *Neuron.* 2016;92(6):1164-1167.
124. Somjen GG. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1979;41:159-177.
125. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1065-1096.
126. Sotelo-Hitschfeld T, Niemyer 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.

127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. Yoon S, Zuccarello M, Rapoport RM. pCO₂ and pH regulation of cerebral blood flow. *Front Physiol.* 2012;3:365.

12. Közleményjegyzék

12.1. 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.

12.2. 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, Hugyecz 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. Hugyecz 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, Hugyecz M, Institóris 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. Institóris 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-Szuki 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**, Institóris 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, Institóris 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, Institóris 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**, Keijser 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**, Institóris 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, Högyes 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.

12.3. 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.

12.4. 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.

13. 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	---	54	1360	1665
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	2	20	20
szakcikk, magyar nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként 3	---	2	34	79
összefoglaló közlemény	---	8	1246	1293
rövid közlemény	---	0	0	0
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	3	---	---	---
idegen nyelvű	---	3	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény 4	2	---	---	---
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
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	---	4	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	0	0
Oltalmak (szabadalmak)	---	0	0	0
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	22	2027
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma 2	17	182
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2001) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	55	1778
Az utolsó 10 év (2009 - 2019) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	34	601
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	712	22,83%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	1
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő 7	0	0

14. 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 ma is működő 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 a 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 Institoris Ádámmal. Külön köszönöm az elmúlt öt évben Menyhárt Ákosnak az inspiráló beszélgetéseket.

Köszönöm Szüleimnek, hogy a környezetére kíváncsi gyerekként megismerhettem a felfedezés és az alkotás örömét, hogy választott tanulmányaimban és törekvéseimben támogattak. Köszönöm férjemnek, Rajmondnak, és kisleányomnak, 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.

