

## Nagy Zoltán professzor kérdéseire, megjegyzéseire adott válaszok

Köszönöm Professzor Úrnak dolgozatom részletes bírálatát, sokrétű kérdéseit, őszinte érdeklődését és támogató véleményét.

Feltett kérdéseire, megjegyzéseire a következőkben válaszolok:

### 1. Kérdéskör:

- Az SD kialakulásában elsősorban a neuronoknak tulajdonítanak meghatározó szerepet. Oscar Herreras és George Somjen kutatásai szerint a hippocampális piramissejtek szintjén a proximális apikális dendritek vesznek részt legnagyobb affinitással az SD-ben (Herreras és Somjen, 1992; Kager et al., 2002; Makarova et al., 2010). A neuronok depolarizációban betöltött vezető szerepe mellett a repolarizációhoz elengedhetetlen az asztrociták fiziológias működése. Az asztrociták feltehetően az SD kiválthatósági küszöbét is hangolják az extracelluláris tér ion és aminosav-összetételének puffereálásával, 4.1-es  $K^+$  csatornákon ( $K^+$  szifon) és serkentő aminosav transzporterek működésén keresztül (glutamát visszavétele) (1. ábra). A vaszkuláris elemek sejtszintű érintettsége (az SD-re adott áramlási válasz) inkább következmény.

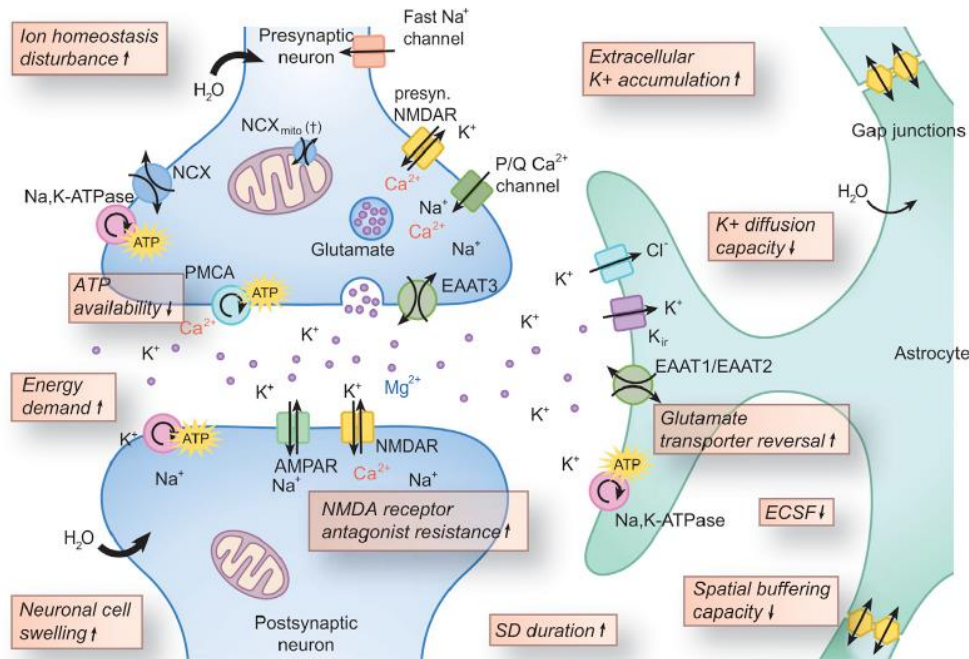
Már az 1950-es években megfogalmazódott az SD kiváltásának mind a kálium (Grafstein, 1956) mind a glutamát központú hipotézise (Van Harrevel, 1959). Az extracelluláris  $K^+$  koncentráció ép idegszövetben 3-4 mM-hoz közelít. A kísérletes agyi hipoxia vagy iszkémia során az extracelluláris  $K^+$  koncentráció lassan, fokozatosan emelkedik, majd a 10-15 mM  $K^+$  szint elérésénél spontán SD alakul ki (Hansen, 1977; Hansen és Zeuthen, 1981). A  $K^+$  kiáramlás feltehetően az intracelluláris ATP szint csökkenésével függ össze, ami neuronális ATP-függő  $K^+$  csatornák nyitását és a  $K^+$  kiáramlását idézi elő (Sun és Hu, 2010). Ugyanakkor a  $K^+$  visszavétele lassul, mert ATP hiányában a  $Na^+/K^+$  pumpa hatékonysága is csökken (Hajek et al., 1996). A közelmúltban azt is leírták, hogy maga az iszkémiás penumbra jellemző, növekvő  $K^+$  szint akár 50 %-al is csökkentheti a  $Na^+/K^+$  pumpa működésének hatékonyságát (Major et al., 2017). Ismert továbbá, hogy a  $Na^+/K^+$  pumpa farmakológiai blokkolása ouabainnal SD-t idéz elő (Balestrino et al., 1999). Összegezve, a növekvő extracelluláris  $K^+$  koncentráció a membránpotenciált a depolarizáció irányába tolja el, feszültség függő  $Na^+$  csatornák nyílását és  $Na^+$  beáramlást idéz elő, amely egy kritikus szövettér fogatban ( $\sim 1 \text{ mm}^3$ ) az SD-t vált ki (Grafstein, 1956; Somjen, 2001; Tang et al., 2014).

A glutamát szerepe az SD kiváltásában ma ismét vitatott, bár az SD terjedésében a glutamát valószínűleg részt vesz (Hertelendy et al., 2019). Egyfelől a glutamát hipotézis mellett szól, hogy NMDA receptor blokkolókkal (pl. ketamin vagy MK-801) csökkenthető az ismétlődő SD-k előfordulási gyakorisága ép, vagy enyhe metabolikus stressznek kitett szövetben (Klass et al., 2018). Másfelől lényeges megfigyelés, hogy a szöveti glutamát koncentráció emelkedése az SD-t időben kis késéssel követi, nem megelőzi (Enger et al., 2015). A súlyosan iszkémiás szövetben továbbá az NMDA receptor blokkolása nem gátolja az SD-t (Pietrobon and Moskowitz, 2014). Saját, legfrissebb eredményeink arra mutatnak rá, hogy ha ödéma vagy asztrocita diszfunkció következtében emelkedik a szöveti glutamát koncentráció, az SD fókusza jelentősen megnő (Menyhárt et al., 2020).

Az ellentmondások feloldását a kanadai R. David Andrew abban látja, hogy az SD kiváltásában a döntő szerep egy eddig még nem azonosított mechanizmusnak vagy csatornának tulajdonítható. Elképzelését egy 1992-es közleményre alapozza (Czéh et al., 1992), mely egy nem specifikus  $Na^+/K^+$  csatorna szerepét veti fel az SD-vel befelé irányuló  $Na^+$  áramban és az SD létrejöttében. Elmélete

szerint adott körülmények között a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa ioncsatornává alakul, és az SD-t kezdeményező kation áramok ezen keresztül valósulnak meg.

Összefoglalva, az SD kiváltásában a jelen ismereteink szerint elsősorban kation áramok vesznek részt, és a glutamát valószínűleg érzékenyítheti a szövetet az SD-re. Az SD kialakulását metabolikus stressz és ATP depléciónak következményként foghatjuk fel, ugyanakkor az SD kapcsán felhalmozódó glutamát az idegsejtekre nézve toxikus.



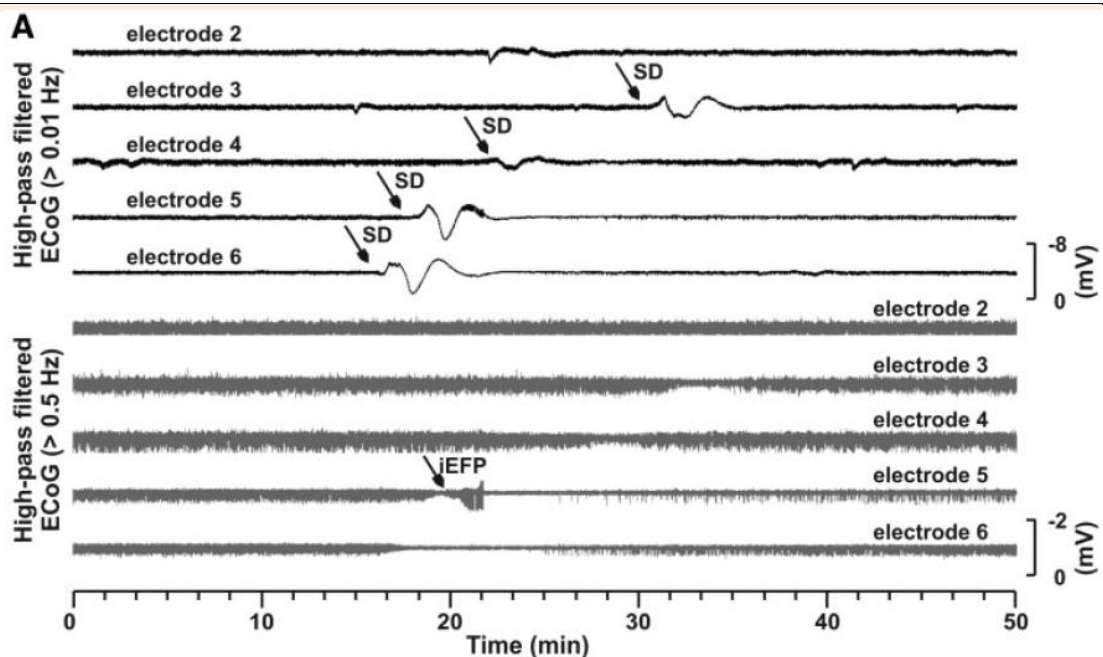
1. ábra. Az SD kialakulásában szerepet játszó sejtszintű folyamatok az iszkémiás penumbra területén (forrás: Dreier és Reiffurth, 2015)

- Az SD az epilepsziával kapcsolatosan és az aurás migrénben egyaránt fontos kórélettani jelenség. Az epilepsziás görcsaktivitás és az SD közötti kapcsolatot régóta tanulmányozzák, hiszen az SD-t először az epilepszia kísérletes nyúl modelljében figyelték meg (Leao, 1944). Az epilepsziás görcsaktivitás és az SD-ben közös, hogy az akut agysérülésekkel együtt járnak, és rontják a kórállapotok neurológiai kimenetelét (Dreier et al., 2017). Mindkét jelenség az idegszövet fokozott ingerlékenységéhez, hiperexcitabilitáshoz köthető, bár az epilepsziás görcsaktivitást a neuronok szinkronizált tüzelése jellemzi, míg az SD az idegszöveti elektromos aktivitás szinkronizált depresszióját vonja maga után (Mody et al., 1987; Kramer et al., 2017; Kros et al., 2018). A két jelenség közötti összefüggés ellenére nem ismerjük részleteiben a kapcsolat háttérében álló mechanizmusokat. Kísérletes bizonyítékok tanúsítják, hogy az epilepsziás görcsaktivitás hajlamosít az SD-re (Koroleva and Bures, 1983; Gorji et al., 2001; Gorji and Speckmann, 2004; Fabricius et al., 2008), ugyanakkor az SD megjelenése késleltetheti vagy felfüggesztheti az epilepsziás görcsaktivitást (Kesner et al., 1965; Schneiderman et al., 1972; Kramer et al., 2017). Bonyolítja a két jelenség közötti kapcsolat megértését, hogy az SD-hez társulhat is görcsaktivitást (2. ábra) (Dreier et al., 2012; Eickhoff et al., 2014). Megfigyelték azt is, hogy a görcsaktivitás résztvevő szövetterfogatra nem terjed rá az SD (Koroleva and Bures, 1982). Végül az SD-vel járó ECoG depresszió epilepsziára utaló tüskék jelenhetnek meg (Van Harreveld and Stamm, 1953; Koroleva and Bures, 1983; Dreier et al., 2012; Kros et al., 2018). A két jelenség kapcsolata tehát összetett.

Az SD szerepét a migrénes fejfájás kialakulásában Tényi Professor Úr harmadik kérdésére adott válaszomban részletezem, itt kiegészítem az SD kiváltásainak sejtszintű mechanizmusaival.

Migrén esetén az SD megjelenését az idegsejtek könnyebb ingerelhetőségéhez, hiperexcitabilitáshoz kötik, melyet neuronális feszültség-függő  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák szabályoznak (Misonou, 2010). A feszültségfüggő kation csatornák molekuláris szerkezeti átrendeződése vagy genetikai alapú funkciómódosulása az SD kiváltási küszöbét befolyásolhatja. Például az örökldő, féloldali bénulással járó migrén 3. típusára (familial hemiplegic migraine type 3, FHM3) jellemző a feszültségfüggő 1.1 típusú  $\text{Na}^+$  csatorna  $\alpha 1$  alegységének mutációja, mely összefügg a neuronális ingerelhetőség növekedésével, és az SD kiválthatósági küszöbének csökkenésével (Dichgans et al., 2005). Az FHM1-et ugyanakkor a feszültségfüggő P/Q típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák kódoló gén „gain-of-function” mutációja jellemzi, ami növeli a csatornák nyitásának valószínűségét (van den Maagdenberg et al., 2004). A mutáció a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák nyitásához köthetően csökkenti az SD kiválthatósági küszöbét (Tottene et al., 2009).

Összefoglalva, az SD keletkezését az epilepszia és a migrén kapcsán is bizonyítottak vélem, dolgozatomban helye lett volna bemutatni a két kórállapotot is. Talán azért siklottam el felettük, mert kísérletes munkáink kapcsán elsősorban az akut agysérülésekre koncentráltam.



**2. ábra.** Az SD-hez alkalmanként epilepsziás görcsaktivitás társulhat. A humán kéregre elhelyezett elektródasor 5. csatornáján észlelték az SD-t, és a ráépülő iktális aktivitást az aneurizmás SAH invazív ellátása utáni napokban (forrás: Dreier et al., 2012).

- Valóban úgy lett volna helyes, ha az iszkémiás sejtkárosodás kifejezést használtam volna a neurodegenerációval szemben, amely a krónikus neurodegeneratív betegségek szakirodalmában meghonosodott fogalom.

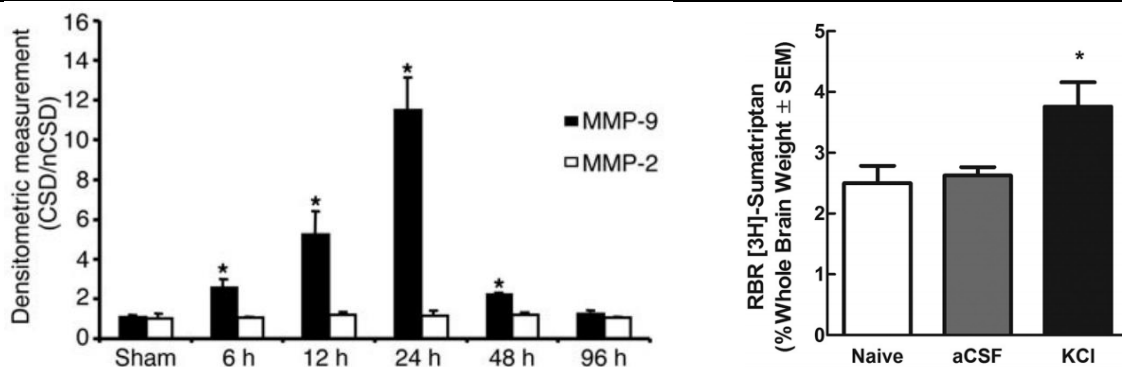
## 2. Kérdéskör:

- Fernandes de Lima módszerét (Peixoto et al., 2001) lényegében változtatások nélkül követtük a retinán kiváltott SD elektrofiziológiai és IOS optikai képkötő megjelenítésére, melyet referenciának tekintettünk az RH1838 alapú fluoreszcens képkötőhöz. Az RH1838 festék fejlesztése egy izraeli munkacsoporthoz kötődik, és a munka hosszú évekre tekint vissza (Grinvald

et al., 1982; Shoham et al., 1999; Grinvald és Hildesheim, 2004). A festék régóta kereskedelmi forgalomban kapható. A feszültségfüggő festék alapú képalkotás módszere ismert volt, széles körben használták a neuronális aktivitás funkcionális szerveződésének tér- és időbeli feltérképezésére például macska vagy főemlős agykéregben (Arieli et al., 1995; Shoham et al., 1999; Slovín et al., 2002). Újításunk abban állt, hogy az SD követésére elsőként adaptáltuk a módszert; az egyedi képalkotó rendszerünket saját magunk állítottuk össze úgy, hogy az SD megfigyelésére optimális legyen. A rendszer összeállításakor szintén egyedi jelleg volt, hogy a membránpotenciál képi megjelenítését számos hemodinamikai modalitással kombináltuk.

### 3. Kérdéskör:

- A vér-agy gát barrier funkciójának módosulása izgalmas kutatási terület az SD szempontjából is, hiszen az SD ép agyszövetben átmenetileg fokozza az endotheliális transzcitózist és a paracelluláris diffúziót (Cottier et al., 2018; Sadeghian et al., 2018). Az SD kapcsán a vér-agy gát megnyílása összefügg az MMP9 fokozott szintézisével (3. ábra) (Gursoy-Ozdemir et al., 2004). Az SD és az MMP9 kapcsolatára a sérült agyban szemléletes példát hoz egy esettanulmány, mely egy állományi vérzésen átesett betegen a hematóma körüli ödémás régióban az MMP9 koncentrációjának emelkedését SD-k ismétlődő megjelenéséhez kötötte (Schiefeker et al., 2015). Kutatómunkánk során a vér-agy gát megnyílását, az MMP9 kifejeződését eddig nem vizsgáltuk, ugyanakkor szerepel egy 2020. tavaszán benyújtott, elbírálás alatt álló pályázatunk célkitűzései között.



**3. ábra.** Az MMP9 kifejeződésének időbeli felbontása (forrás: Gursoy-Ozdemir et al., 2004), és a szumatriptán kilépése az agyszövetbe (forrás: Cottier et al., 2018) SD kiváltása után metabolikusan ép rágcsáló agykéregben.

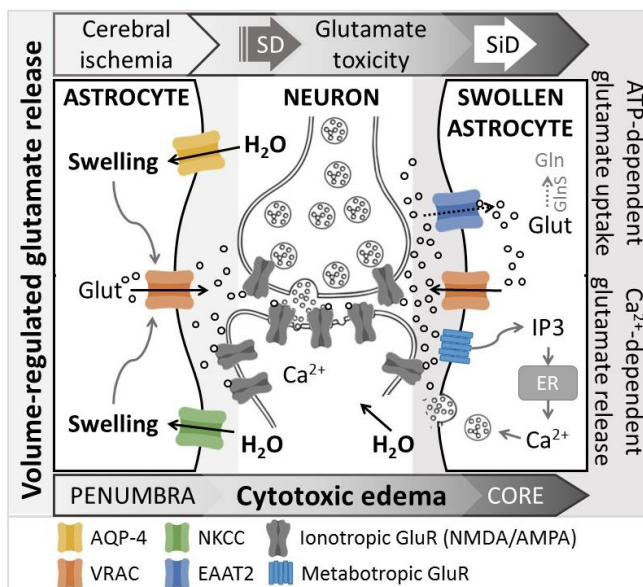
Az SD-ről ismert, hogy a neuronális dendritekben lokális duzzanatot („dendritic beading”) és sérülést okoz (Risher et al., 2012), ugyanakkor az extracelluláris tér zsugorodik (Dreier et al., 2018). A neuronokat érintő citotoxikus sejtduzzanat és az SD kapcsolatát mára annyira meghatározónak vélik, hogy az SD-t a citotoxikus ödéma elsődleges mechanizmusaként említik (Dreier et al., 2018). A disszertációm elkészülte után kezdtünk el a szöveti ödéma és az SD kapcsolatával behatóan foglalkozni, vizsgálataink az asztrocitákra fókuszálnak. A kutatás hipotézisei szerint (4. ábra) az iszkémiás penumbra jellemző hipo-oszmotikus stressz asztrocita-duzzadást okoz AQP-4 csatornákon és/vagy  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  ko-transzporter (NKCC) aktiváción, ill. térfogat függő anion csatornákon (volume-regulated anion channels, VRAC) keresztül. Az asztrociták térfogat-függő glutamát ürítése növeli a neuronok ingerelhetőségét, kedvez az SD kialakulásának (önmagában nem elégséges az SD kiváltásához). A felsorolt mechanizmusok – egyenként vagy együttesen – a citotoxikus ödéma kialakulásához és excitotoxikus mértékű glutamát felhalmozódásához vezetnek.

Végül az SD során a neuronok is megduzzadnak, amely súlyosbítja és visszafordíthatatlanná teszi a citotoxikus ödémát, és a penumbra régió irreverzibilis károsodását okozza.

A reperfüzió időszakát eddigi tanulmányainkban csak érintőlegesen, és az életkor mint rizikófaktor kapcsán vizsgáltuk. Leírtuk, hogy az öregedéssel megnő a magasabb perfúziós értékek relatív területi aránya reperfüziós állapotban, ami az idős agyban feltételezhetően növeli az oxidatív stressz és így a reperfüziós károsodás mértékét (Bálint et al., 2019).

A neuroinflammáció a stroke-ban központi szerepet játszik (pl. Doll et al., 2014). A gyulladási folyamatok és az SD kapcsolatát az elmúlt két évben egy kollaborációs együttműködés részeként tanulmányoztuk Dénes Ádám laboratóriumával. Azt tapasztaltuk, hogy a mikroglia részt vesz az SD kiválthatósági küszöbének hangolásában, aktiváltsági állapotától függően (Varga et al., 2020). Mások azt állapították meg, hogy a mikroglia által termelt gyulladásmédiátor  $TNF\alpha$  dózisfüggő módon a gátló interneuronokon a  $TNFR2$ -t aktiválja, GABA felszabadulást idéz elő, így csökkenti az SD amplitúdóját (Richter et al., 2014). Az SD ugyanakkor maga is neuroinflammációs folyamatokat indíthat be; fokozza az interleukin- $1\beta$ , a kemokin ligand-2 és a  $TNF\alpha$  mRNS-ének átírását (Takizawa et al., 2020).

A citokinek emelkedett szintje fokozza az endothel sejteken az adhéziós molekulák kifejeződését (pl. Doll et al., 2014). A citokin-adhezin rendszer aktivációja és a „sludge” képződés eddig nem került érdeklődésünk látóterébe, és a szakirodalomban sem találtam az SD-re vonatkozó közleményt a témában.



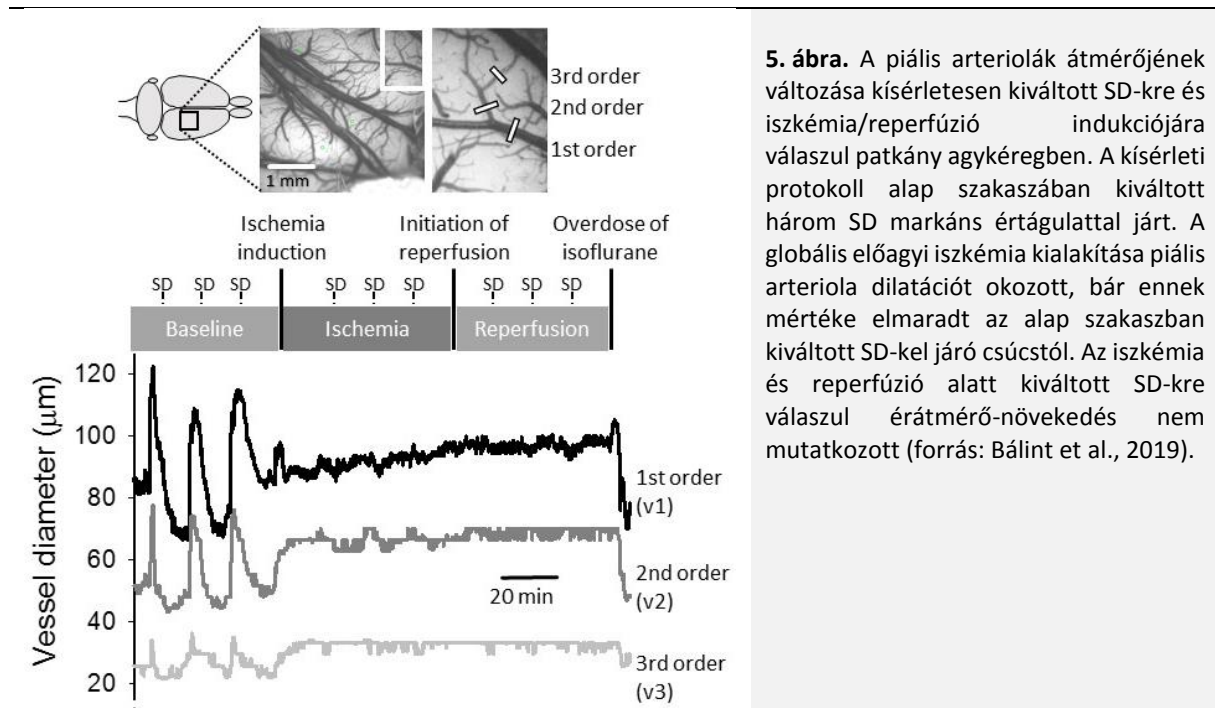
**4. ábra.** Sejtszintű, molekuláris mechanizmusok, melyek érzékenyíthetik az idegszövetet az SD kialakulására, és fokozzák az SD idegsejtkárosító hatását. Rövidítések: AQP-4, aquaporin-4; EAAT2, serkentő aminosav transzporter-2; ER, endoplazmatikus retikulum; IP3, inozitol-trifoszfát; Gln, glutamin; GluR, glutamát receptor; GlnS, glutamin-szintáz; Glut, glutamát; NKCC,  $Na^+/K^+/Cl^-$  ko-transzporter; SiD, szimultán depolarizáció; SD, terjedő depolarizáció; VRAC, volumen-szabályozott anion csatorna.

#### 4. Kérdéskör:

- Az 5.1. fejezetben bemutatott kísérletekben megfigyeltük, hogy az iszkémia során kialakuló SD-k estén értékelhető CBF változás nem jelentkezett (5.1.2. ábra). Az erek átmérőjét a kísérletek akkori stádiumában (2007-2008) nem tudtuk monitorozni; a piális erek átmérőváltozásának követésére a zöld IOS alapú képalkotás bevezetésekor nyílt lehetőség (Farkas et al., 2010). Akkori ismereteink szerint a jelenséget azzal magyaráztuk, hogy az iszkémia előidézésekor a vazodilatátor adozin termelődése fokozódik, és az ATP szint csökkenése is értágító a vaszkuláris simaizomsejtek  $K_{ATP}$  csatornáinak nyitása révén (Cippola, 2009), a létrejött értágulat pedig nem

teszi lehetővé a további vazodilatációt. A disszertáció beadása utáni eredményeink az elképzelést részben igazolják, részben más megvilágításba helyezik (Bálint et al., 2020). A kétoldali a. carotis communis elszorításával létrehozott iszkémia patkány modelljében a piális arteriolák átmérőjét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy valóban kialakul az iszkémia létrejötte után egy értágulat, amely leginkább a kisebb bazális tónusú arteriolákra jellemző (5. ábra) (Bálint et al., 2019). Az iszkémia során kiváltott SD-kel azonban további vazodilatáció nem jelentkezett (5. ábra). Eredményeink ilyen szempontból összhangban állnak a disszertáció 5.1. fejezetében tárgyaltakkal.

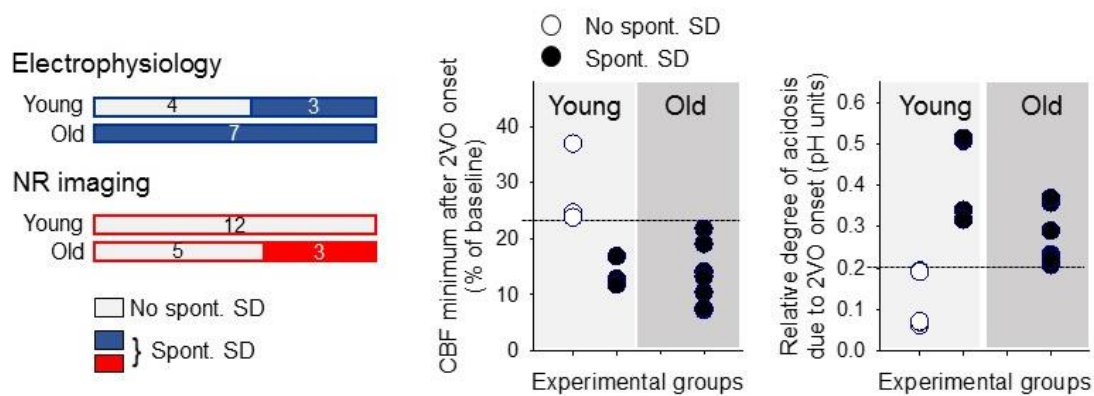
Azt tapasztaltuk azonban, hogy modellünkben az iszkémiát követő arteriola dilatáció nem az elérhető maximális, mértéke alul maradt az iszkémia előtti szakaszban kiváltott SD-kre jelentkező értágulat maximumától (5. ábra). Ezek alapján nem magyarázhatja az iszkémia alatti maximális értágulat az SD-vel kapcsolatos CBF válasz elmaradását (5.1.2. ábra). Kísérletes eredmények bizonyítják, hogy iszkémia/reperfúzió után a macska piális ereiben a vazokonstriktív érválaszok megtartottak, míg az acetil-kolinnal kiváltott vazodilatáció sérül (Mayhan et al., 1988). Iszkémiát követően újszülött malacban a hiperkapniával indukált vazodilatáció is elmarad (Bari et al., 1998). Lehetséges tehát, hogy a vazodilatációért felelős mechanizmusok sérülése miatt nem láttunk hiperémiát az iszkémia alatt jelentkező SD-kkel összefüggésben (5.1. fejezet).



- A mért áramlási értékek alapján a megfigyelt kérgi felszín az iszkémiás penumbának feleltethető meg (CBF: 20-40 % között, Astrup et al., 1981). Az elfogadott álláspont szerint az SD-k zömében a penumbra területéről indulnak ki (von Bornstädt et al., 2015; Hartings et al., 2017), de a későbbi iszkémiás mag területén is jelentkezhet korai SD, ami jellegét tekintve terminális, iszkémiás neuronális sejtkárosodást hagy maga után (Hartings et al., 2017). Az elhalt régióban a későbbiekben ismétlődő SD-k nem jelentkeznek, a penumbában keletkezett SD-k nem terjednek be a terminális SD által érintett területre (Nakamura et al., 2010).

Az SD kiváltásában egy lokális metabolikus krízist sejtenek: a metabolikus szubsztrát-felhasználás és a gátolt szubsztrát-ellátásból adódó hiányt tartják felelősnek az SD kialakulásáért (von Bornstädt et al., 2015). A lokális érzékület részese lehet ennek a folyamatnak.

- Az SD-k keletkezésében saját méréseink alapján egy kritikus faktor lehet a perfúzó lokális csökkenése, vagy a metabolikus krízis mértéke (6. ábra; Oláh professzor 12. kérdésre adott válasz). A neuronok vagy az apikális dendritok sűrűsége is meghatározó lehet, hiszen magas  $K^+$  koncentrációjú médiumban inkubált patkány vagy egér élő agyszelet preparátumokban kimutatták az SD-t az agykéregben, a hippocampusban, a striátumban és a thalamusban, de ugyanazon körülmények között nem jelent meg SD a hypothalamusban és az agytörzsben (Andrew et al., 2017). Azonban metabolikus vagy ozmotikus krízis esetén a kéregnél alacsonyabb neuronsűrűség mellett a striátumban is rendre kialakul az SD (Vinogradova et al., 1991; Kunimatsu et al., 1999), melyet a mi élő agyszelet preparátumon végzett kísérleteink is igazolnak. Végül az agytörzsön is végig haladhat SD, ha az idegszövet ingerelhetősége a fiziológiánál magasabb (pl. SUDEP; Tényi professzor 6. kérdésére adott válasz) (Aiba és Noebels, 2015; Loonen et al., 2019). Mindezek jelzik, hogy az SD kialakulásának feltételei multifaktoriálisak.



**6. ábra.** A spontán SD kialakulásához kedvező feltételek. A disszertáció 5.4. és 7.4. fejezeteiben tárgyalt kísérletek során két módszerrel, pH-szenzitív elektródával (kék színek) és Neutral red (NR) pH indikátor alapú fluoreszcens képalkotással vizsgáltuk (piros színek) az SD-vel kapcsolatos szöveti metabolikus változásokat. A telített színezés jelzi azokat a kísérleteket, amelyekben spontán SD-t regisztráltunk az a. carotis communis elszorítását követő percekben. A grafikonokon látható, hogy az SD megjelenése egy adott perfúziós illetve metabolikus küszöbhez volt köthető, az életkortól függetlenül (forrás: Menyhárt et al., 2017).

## 5. Kérdéskör:

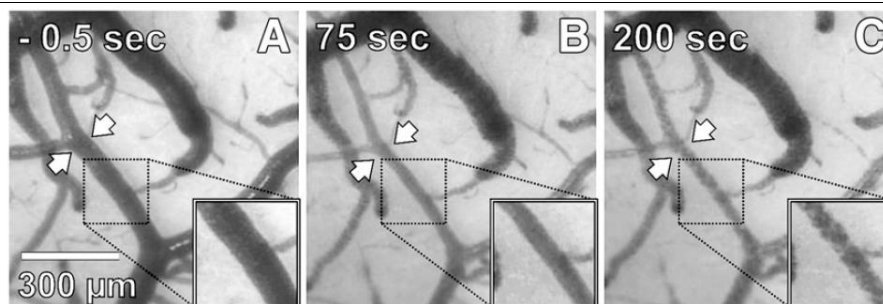
- Az SD keletkezése a jelen ismeretanyag szerint a lokális metabolikus krízis függvénye. Elképzelhető, hogy a perfúzió inhomogén eloszlása miatt az iszkémiás magtól viszonylag távol is kialakulhatnak ilyen gócpontok.
- Az SD-k terjedése jellemzően radiális irányú. Úgy gondolom, hogy a megfigyelt fornto-caudális irányultságot a kialakulás helye határozza meg, ami a vizsgált kérgi területhez képest rostralis helyzetű volt (a látótéren kívül esett). A fókusz helyzetére, illetve a megfigyelt terjedési irányra két magyarázatot találtunk lehetségesnek: az egyik, hogy az SD a striátumban keletkezett (Umegaki et al., 2005), majd onnan anterior irányból terjedt fel a kéregre (Vinogradova et al., 1991). Ezt a lehetőséget Bures professzor csoportja vizsgálta behatóan, és megállapították, hogy az SD a striátumból a rostrális claustrumon keresztül léphet be a kéregbe (Vinogradova et al., 1991), ami okozhatja kísérleteinkben a parietális kérgen észlelt rostro-caudalis terjedési irányultságot. A másik lehetséges magyarázat, hogy az SD a kéregben, az a. cerebri media és az a. cerebri anterior ellátási területeinek határán keletkezett. A terület érchitektúrája és metabolikus érzékenysége miatt úgynevezett kérgi „watershed” infarktuskok létrejöttek

kedvez (Momjian-Mayor és Baron, 2005), ami az SD megjelenésének szempontjából is relevánsnak tűnik. Az elképzelés egybecsengni látszik a Bíráló felvetésével.

- Az SD-vel az agykérgi spontán aktivitás percekig elhúzódó depressziója jár, ami az idegszövet egyidejű lokális ingerelhetetlenségét is jelzi. A háttérben álló mechanizmusok között említik, (i) a poszt-szinaptikus GABA<sub>A</sub> receptorok aktivációját (Phillis és Ochs, 1971), (ii) a dendritek morfológiai elváltozását, duzzadását, a dendrittüskék visszahúzódását (Risher et al., 2012; Takano et al., 2007), (iii) a kalcium és a cink SD-vel járó intracelluláris felhalmozódását (Carter et al., 2013), vagy (iv) az adozin extracelluláris felszaporodását (Lindquist és Shuttleworth, 2012; Lindquist és Shuttleworth, 2017). A felsorolt mechanizmusok egyenként is relevánsak lehetnek, de valószínűbb, hogy változó arányú kombinációjuk okozhatja az SD utáni refrakter állapotot.
- A modell (multi-fokális iszkémia) jellegéből fakadóan egy igen komplex hemodinamikai kép rajzolódott ki, melyet tükrözött a perfúzió térbeli eloszlásának analízise (5.2.2. ábra) A mikroérhálózat anatómiája és az embólusok megújíthatatlan helyzete minden bizonnyal hozzájárult a meglehetősen összetett hemodinamikai változásokhoz.

#### 6. Kérdéskör:

- Az iszkémiával és az SD-vel kapcsolatos anaerob glikolízis, a szöveti acidózis és a neuronkárosodás összefüggéseit Oláh professzor úr 5. és 14. kérdésére válaszul részleteztem.
- A szinaptikus vezikulákban nagy koncentrációban vannak jelen a neurotransmitterként szolgáló aminosavak. A vezikulákban uralkodó pH 6,0 alatti értéket vehet fel (pH 5,67 ± 0,71; Miesenböck et al., 1998), erre történt az utalás, melyet egy az agyi pH szabályozását összefoglaló meghatározó közlemény gondolatmenete mentén tettem (Chesler, 2003).
- A vér alakos elemeinek összezsapzódását egy korábbi kísérletsorozatunkban a szívfunkció megszűnése után a piális arteriolákban figyeltük meg először (7. ábra) (Farkas et al., 2010). A véreztetéses sokkal súlyosbított globális előagyi iszkémia modellünkben nem tértünk ki a jelenség tárgyalására, de lkalmanként a zöld IOS képsorokon megfigyelhető volt.
- A vér-agy gát károsodást lehetett volna Evans kék extravazációval képileg monitorozni egyidejűleg a többi változóval, különösen az agyszöveti pH változásokkal, de ilyen irányú vizsgálatokat nem végeztünk.



**7. ábra.** A szívfunkció megszűnése utáni percekben a piális arteriolák átmérője csökken (B), majd 2-3 perc múlva a vér alakos elemeinek összezsapzódása figyelhető meg (C) zöld IOS képalkotással patkány agykérgen (forrás: Farkas et al., 2010).

#### 7. Kérdéskör:

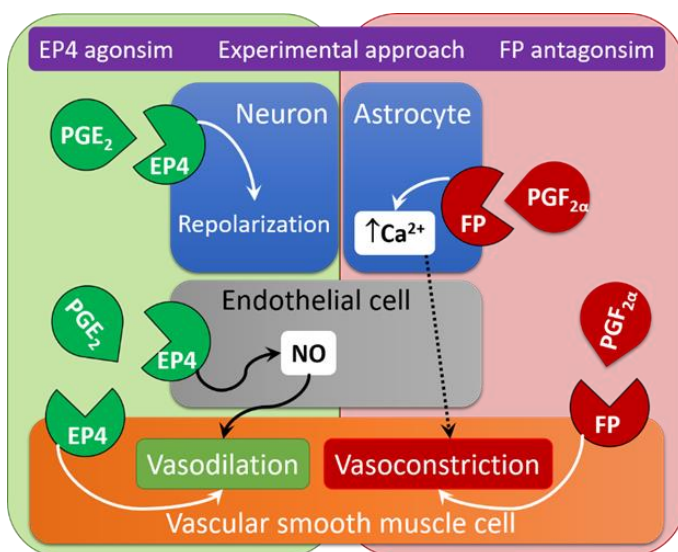
- Az említett AE1-329 EP<sub>4</sub> receptor agonistához hasonlóan az L161,982 EP<sub>4</sub> receptor antagonistá affinitást mutat a neuronok és vaszkuláris simaizomsejtek mellett az endothelsejtek EP<sub>4</sub>



receptoraihoz is, melyet endothelsejt-kultúrán végzett kísérletek egyértelműen bizonyítanak (Yanni et al., 2009; Hoang et al., 2015). Az L161,982 hozzáadása humán retinából származó mikrovaszkuláris endothelsejt kultúrához csökkentette a VEGF-indukálta proliferációt (Yanni et al., 2009), és a humán köldökzsinór vénából származó endothelsejteken csökkentette a sejtek migrációját és csökkepő tulajdonságát (Hoang et al., 2015). A kísérletekből következik, hogy az endotheliális EP<sub>4</sub> receptor aktivációja elősegíti az angiogenezist is, az említett eNOS felszabadulásán keresztül elért vazodilatátor hatásán túl. Agyi érpreparátumokban is bizonyították az EP<sub>4</sub> receptor értágító hatását, bár ezt a vaszkuláris simaizom relaxációjához kötétték (Davis et al., 2004; Lacroix et al., 2015). Összegezve az EP<sub>4</sub> receptorok az érfalban az endotheliumon és a vaszkuláris simaizomsejteken is jelen vannak, aktiválásuk vazodilatációt és angiogenezist indukálhat (8. ábra).

Kísérleteinkben élettani változókból következtettünk az iszkémiás károsodásra (elektrofiziológia és CBF mérés). Az L161,982 alkalmazása mellett a kísérletek egyharmadánál a súlyos iszkémia a kísérleti protokoll pontos kivitelezését megghiúsította (6.1.2. táblázat), tehát az EP<sub>4</sub> receptor gátlása súlyosabb károsodásra enged következtetni. Az iszkémiás károsodás mértékét szövettani módszerrel a kísérletsorozatban nem értékeltük, erre későbbi munkáinkban vállalkoztunk. A prosztaglandin szignalizációval kapcsolatban a PGF<sub>2α</sub> FP receptorának antagonizmusával csökkenteni tudtuk iszkémia modellünkben a kaszpáz-3-al jelölt apoptotikus sejtek számát (Varga et al., 2020b).

- Az L902,688 EP<sub>4</sub> receptor agonista, az L161,982 EP<sub>4</sub> receptor antagonist, hatásuk ellentétes (Markovic et al., 2017). Az említett publikáción kívül (DeMars et al., 2018) nem találtam olyan közleményt, amely konkrétan az L902,688 hatását írja le agyi iszkémiával kapcsolatban. Ugyanakkor számos publikáció értekezik a más szerekkel (pl. AE1-329) megvalósított EP<sub>4</sub> receptor agonizmus jótékony hatásáról kísérletes agyi iszkémia modellekben (pl. Liang et al., 2011). Ezek alapján terveztük felmérni az EP<sub>4</sub> receptor agonizmusának hatását az SD-re AE1-329 vagy L-902,688 alkalmazásával (Varga Dániel kollégám 2018-as 128745 sz. OTKA pályázata) (8. ábra), de forráshiány miatt a tervezett kísérleteknek csak egy részét valósítottuk meg (Varga et al., 2020b).



**8. ábra.** Az EP<sub>4</sub> receptor agonizmusával és az FP receptor antagonizmusával az SD gátlásán keresztül terveztük elérni az iszkémiás sérülés enyhítését (forrás: Varga Dániel 128745 sz. OTKA pályázata, 2018). Az FP receptor antagonizmusával kapott eredményeket a közelmúltban publikáltuk (Varga et al., 2020b).

## 8. kérdéskör:

- Az állatokat a kísérletekhez magunk neveltük, születési időpontjuk ismeretében a kísérletekbe életkoruk alapján válogattuk be őket. Testtömegüket elsősorban fizikai jellemzésükhöz, farmakológia szerek dozírozásához mértük meg. Az idős korcsoportok összetételét az szabta meg, hogy az állatok jó egészségben meddig voltak tarthatók. Sajnos tapasztalat, hogy az idősödő állatok nem patogénmentes állatházban gyakran kapnak fertőzéseket, mely számunkra ésszerűségi határt szabott. Valószínű, hogy a nagyobb életkorkülönbségek valóban potenciózták volna a korcsoportok közötti különbségeket. Alátámasztásul, a piális érhálózat sűrűségének csökkenése pl. 24 hónapos egérben még csak tendenciózan mutatkozott meg a 3 vagy a 16 hónaposakhoz képest, és majd csak 31 hónapos korra érte el a szignifikánsan alacsonyabb értéket (Faber et al., 2011).

## 9. Kérdéskör:

- Azokat a molekuláris vagy sejtszintű mechanizmusokat, melyek szerepet játszhatnak abban, hogy a növekvő életkorral együtt nő az SD kiválthatósági küszöbe, megnyúlik időtartama, és csökken a frekvenciája, a 9. ábrán gyűjtöttük össze egy összefoglaló közlemény előkészítése során (Hertelendy et al., 2019).

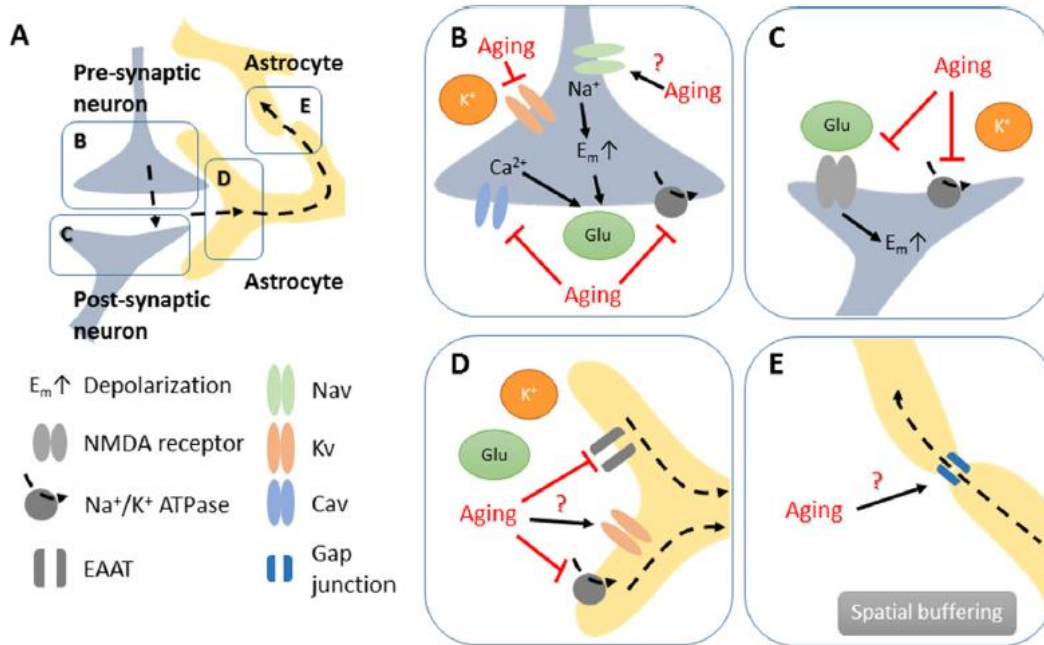
A növekvő életkorral nem egyértelmű a neurondenzitás csökkenése, de jó korreláció állítható fel az életkor növekedése és a dendrittüskék számának csökkenése között (Terry és Katzman, 2001). Nehéz megállapítani, az SD-re a szövettani és vélhetően funkcionális átrendeződés milyen direkt hatással van. A dendritek viszont érzékenyen, ödémásodással reagálnak az SD-re, így bizonyára érintettek az SD terjedésében (Risher et al., 2012, Takano et al., 2007). Ez szolgál alapul annak a feltételezésnek, hogy a dendritek szerkezete esetleg beleszólhat az SD kialakulásába, de egyértelmű összefüggés nem mutatható ki.

Az öregedéssel az asztrociták morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül (Verkhatsky et al., 2016), és az öregedésre jellemző pro-inflammatorikus fenotípus („senescence-associated secretory phenotype”, SASP) jellegzetességeit mutatják (Salminen et al., 2011). A funkcionális változások között megemlíthető a  $K^+$  és glutamát clearance csökkenése. Például a zárt koponyasérülés kísérletes modelljében idős egerekben a sérült terület peremén markánsabban csökkent a Kir4.1  $K^+$  csatornák és a serkentő aminosav transzporterek kifejeződése, mint fiatalokban (Gupta és Prasad, 2013). Továbbá az öregedésre jellemző, növekvő asztrocita GFAP kifejeződéssel együtt a serkentő aminosav transzporterek csökkenő jelenlétét állapították meg (Salminen et al., 2011; Simpson et al., 2010). Leírták az asztrociták csökkenő glutamát érzékenységét is az öregedés során (Lalo et al., 2011). Az asztrociták mindezen funkció-módosulása lassíthatja az SD utáni repolarizációt.

- Az életkorral csökkenő neuronális ingerelhetőség több okra vezethető vissza. Az életkor előrehaladtával az idegrendszer egyre növekvő oxidatív stressznek van kitéve a szabadgyökök fokozott termelése, az antioxidáns enzimszerek gyengülése, vagy a kettő kombinációja révén. A fokozott lipid peroxidációt felelősnek találták a neuronális ingerelhetőség életkorral összefüggő csökkenésében (Watson et al., 2014). Szerepe lehet az ingerelhetőség csökkenésében pl. az NMDA receptor redox-mediált alul működésének, de a redox állapot változása az öregedés során befolyásolhatja különböző neurotranszmitterek (glutamát, GABA, katekolaminok) ürülését is (Kumar et al., 2018).

Az SD-ben résztvevő ioncsatornák, köztük a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák és BK csatornák funkciója (kapuzásuk, oligomerbe rendeződésük, átjárhatóságuk) módosulhat az öregedéssel növekvő

oxidatív stressz miatt (Sesti et al., 2016). A feszültségfüggő P/Q típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák kifejeződése alacsonyabb az idős agyból nyert szinaptoszómákban a fiatalhoz képest (9. ábra) (Iwamoto et al., 2004). A gondolatmenetbe teljesen illeszkedik az említett közleményben leírt mitokondriális ioncsatorna diszfunkció (Strickland et al., 2019). Az idős agyban a kationcsatornák változó kifejeződése és funkciójuk módosulása egyaránt befolyással lehet az SD magasabb kiválthatósági küszöbére.



**9. ábra.** A feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák funkciómódosulása, a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák kifejeződésének csökkenése az öregedéssel megváltoztathatja az SD kiválthatóságát. Az ioncsatornákat érintő változások mellett más mechanizmusok is részt vehetnek az SD öregedéssel összefüggő módosulásában. A növekvő életkorral az NMDA receptor alegységek kifejeződésének csendesítése az NMDA receptor-alapú glutamát szignalizációt gyengítheti, mely az SD terjedési sebességét csökkentheti. A  $\text{K}^+$  visszavétele sérülhet a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa öregedéssel gyengülő aktivitás miatt. Korfüggő módon csökken továbbá a  $\text{K}^+$  visszavétele az asztrociták Kir4.1-es csatornáin, és a glutamát felvételének képessége a serkentő aminosav transzporterek alacsonyabb kifejeződése miatt. A  $\text{K}^+$  és glutamát kinn maradása az extracelluláris térben elnyújthatja az SD-t, késleltetheti a repolarizációt. Végül az asztrociták térbeli puffer kapacitása is romolhat az életkor előrehaladtával. Rövidítések: EAAT, serkentő aminosav transzporter-2; Cav, feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna; Glu: glutamát; Kv, feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatorna; Nav: feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatorna; (forrás: Hertelendy et al., 2019)

Szeged, 2020. október 29.

*Farkas Eszter*

Dr. Farkas Eszter

## Felhasznált szakirodalom:

Aiba I, Noebels JL. Spreading depolarization in the brainstem mediates sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models. *Sci Transl Med*. 2015 Apr 8;7(282):282ra46.

Andrew RD, Hsieh YT, Brisson CD. Spreading depolarization triggered by elevated potassium is weak or absent in the rodent lower brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 May;37(5):1735-1747.

Arieli A, Shoham D, Hildesheim R, Grinvald A. Coherent spatiotemporal patterns of ongoing activity revealed by real-time optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex. *J Neurophysiol*. 1995 May;73(5):2072-93.

Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981 Nov-Dec;12(6):723-5.

Balestrino, M., Young, J., Aitken, P., 1999. Block of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res* 838, 37-44.

Bálint AR, Puskás T, Menyhárt Á, Kozák G, Szenti I, Kónya Z, Marek T, Bari F, Farkas E. Aging Impairs Cerebrovascular Reactivity at Preserved Resting Cerebral Arteriolar Tone and Vascular Density in the Laboratory Rat. *Front Aging Neurosci*. 2019 Nov 8;11:301.

Bari F, Louis TM, Busija DW. Effects of ischemia on cerebral arteriolar dilation to arterial hypoxia in piglets. *Stroke*. 1998 Jan;29(1):222-7; discussion 227-8.

Carter RE, Seidel JL, Lindquist BE, Sheline CT, Shuttleworth CW. Intracellular Zn<sup>2+</sup> accumulation enhances suppression of synaptic activity following spreading depolarization. *J Neurochem*. 2013 Jun;125(5):673-84.

Cippola MJ. *The cerebral circulation*. Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael, CA, 2009.

Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1183-221.

Cottier KE, Galloway EA, Calabrese EC, Tome ME, Liktó-Busa E, Kim J, Davis TP, Vanderah TW, Largent-Milnes, TM. Loss of Blood-Brain Barrier Integrity in a KCl-Induced Model of Episodic Headache Enhances CNS Drug Delivery. *eNeuro*. 2018 Jul 16;5(4):ENEURO.0116-18.2018.

Czéh, G., Aitken, P. G., & Somjen, G. G. (1992). Whole-cell membrane current and membrane resistance during hypoxic spreading depression. *Neuroreport*, 3(2), 197–200.

Davis, R. J. et al. EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol*. 141(4),580–585 (2004).

DeMars KM, McCrea AO, Siwarski DM, Sanz BD, Yang C, Candelario-Jalil E. Protective Effects of L-902,688, a Prostanoid EP4 Receptor Agonist, against Acute Blood-Brain Barrier Damage in Experimental Ischemic Stroke. *Front Neurosci*. 2018 Feb 20;12:89.

Dichgans, M., Freilinger, T., Eckstein, G., Babini, E., Lorenz-Depiereux, B., Biskup, S., Ferrari, M.D., Herzog, J., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Pusch, M., Strom, T.M., 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *The Lancet* 366, 371-377.

Doll DN, Barr TL, Simpkins JW. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging Dis*. 2014 Oct 1;5(5):294-306.

Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, Shuttleworth CW, 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 May;37(5):1595-1625.

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 May 15;134(Pt B):189-207.

Dreier JP, Major S, Pannek HW, Woitzik J, Scheel M, Wiesenthal D, Martus P, Winkler MK, Hartings JA, Fabricius M, Speckmann EJ, Gorji A; COSBID study group. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain.* 2012 Jan;135(Pt 1):259-75.

Eickhoff M, Kovac S, Shahabi P, Ghadiri MK, Dreier JP, Stummer W, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A. Spreading depression triggers ictal activity in partially disinhibited neuronal tissues. *Exp Neurol.* 2014 Mar;253:1-15.

Enger R, Tang W, Vindedal GF, Jensen V, Johannes Helm P, Sprengel R, Looger LL, Nagelhus EA. Dynamics of Ionic Shifts in Cortical Spreading Depression. *Cereb Cortex.* 2015 Nov;25(11):4469-76.

Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, Epstein SE. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1748-56.

Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol.* 2008 Sep;119(9):1973-84.

Gorji A, Scheller D, Straub H, Tegtmeyer F, Köhling R, Höhling JM, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Werner Panneck H, Oettel F, Speckmann EJ. Spreading depression in human neocortical slices. *Brain Res.* 2001 Jul 6;906(1-2):74-83.

Gorji A, Speckmann EJ. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur J Neurosci.* 2004 Jun;19(12):3371-4.

Grafstein, B., 1956. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 19, 154-171.

Grinvald A, Hildesheim R. VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(11):874-85.

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.

Gupta, R.K., Prasad, S., 2013. Early down regulation of the glial Kir4.1 and GLT-1 expression in pericontusional cortex of the old male mice subjected to traumatic brain injury. *Biogerontology* 14, 531-541.

Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bempohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH, Moskowitz MA. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest.* 2004 May;113(10):1447-55.

Hajek, I., Subbarao, K.V., Hertz, L., 1996. Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 28, 335-342.

Hansen, A.J., 1977. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta Physiol Scand* 99, 412-420.

Hansen, A.J., Zeuthen, T., 1981. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 113, 437-445.

Herreras O, Somjen GG. Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population. *Brain Res.* 1993 May 7;610(2):276-82.

Hoang KG, Allison S, Murray M, Petrovic n. Prostanoids regulate angiogenesis acting primarily on IP and EP4 receptors. *Microvasc Res.* 2015 Sep;101:127-34.

Iwamoto, M., Hagishita, T., Shoji-Kasai, Y., Ando, S., Tanaka, Y., 2004. Age-related changes in the levels of voltage-dependent calcium channels and other synaptic proteins in rat brain cortices. *Neurosci. Lett.* 366, 277–281.

Kager H, Wadman WJ, Somjen GG. Conditions for the triggering of spreading depression studied with computer simulations. *J Neurophysiol.* 2002 Nov;88(5):2700-12.

Kesner RP, O'Kelly LI, Thomas GJ. Effects of cortical spreading depression and drugs upon audiogenic seizures in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1965 Apr;59:280-2.

Klass A, Sánchez-Porras R, Santos E. Systematic review of the pharmacological agents that have been tested against spreading depolarizations Systematic review of the pharmacological agents that have been tested against spreading depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Jul;38(7):1149-1179.

Koroleva VI, Bures J. Stimulation induced recurrent epileptiform discharges block cortical and subcortical spreading depression in rats. *Physiol Bohemoslov.* 1982;31(5):385-400.

Koroleva VI, Bures J. Cortical penicillin focus as a generator of repetitive spike-triggered waves of spreading depression in rats. *Exp Brain Res.* 1983;51(2):291-7.

Kramer DR, Fujii T, Ohiorhenuan I, Liu CY. Interplay between Cortical Spreading Depolarization and Seizures. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2017;95(1):1-5.

Kros L, Lykke-Hartmann K, Khodakhah K. Increased susceptibility to cortical spreading depression and epileptiform activity in a mouse model for FHM2. *Sci Rep.* 2018 Nov 16;8(1):16959.

Kumar A, Yegla B, Foster TC. Redox Signaling in Neurotransmission and Cognition During Aging. *Antioxid Redox Signal.* 2018 Jun 20;28(18):1724-1745.

Kunimatsu T, Asai S, Kanematsu K, Zhao H, Kohno T, Misaki T, Ishikawa K. Transient in vivo membrane depolarization and glutamate release before anoxic depolarization in rat striatum. *Brain Res.* 1999 Jun 12;831(1-2):273-82.

Lacroix, A. et al. COX-2-derived prostaglandin E<sub>2</sub> produced by pyramidal neurons contributes to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex. *J. Neurosci.* 35(34), 11791–11810 (2015).

Lalo, U., Palygin, O., North, R.A., Verkhratsky, A., Pankratov, Y., 2011. Age-dependent remodelling of ionotropic signalling in cortical astroglia. *Aging Cell* 10, 392-402.

Leao AA. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1947 Nov;10(6):409-14.

Liang X, Lin L, Woodling NS, Wang Q, Anacker C, Pan T, Merchant M, Andreasson K. Signaling via the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 2011 Nov;121(11):4362-71.

Lindquist BE, Shuttleworth CW. Adenosine receptor activation is responsible for prolonged depression of synaptic transmission after spreading depolarization in brain slices. *Neuroscience*. 2012 Oct 25;223:365-76.

Lindquist BE, Shuttleworth CW. Evidence that adenosine contributes to Leao's spreading depression in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 May;37(5):1656-1669.

Loonen ICM, Jansen NA, Cain SM, Schenke M, Voskuyl RA, Yung AC, Bohnet B, Kozłowski P, Thijs RD, Ferrari MD, Snutch TP, van den Maagdenberg AMJM, Tolner EA. Brainstem spreading depolarization and cortical dynamics during fatal seizures in *Cacna1a* S218L mice. *Brain*. 2019 Feb 1;142(2):412-425.

Major, S., Petzold, G.C., Reiffurth, C., Windmuller, O., Foddis, M., Lindauer, U., Kang, E.J., Dreier, J.P., 2017. A role of the sodium pump in spreading ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 1687-1705.

Makarova J, Makarov VA, Herreras O. Generation of sustained field potentials by gradients of polarization within single neurons: a macroscopic model of spreading depression. *J Neurophysiol*. 2010 May;103(5):2446-57.

Markovič T, Jakopin Ž, Sollner Dolenc M, Mlinarič-Raščan I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today*. 2017 Jan;22(1):57-71.

Mayhan WG, Amundsen SM, Faraci FM, Heistad DD. Responses of cerebral arteries after ischemia and reperfusion in cats. *Am J Physiol*. 1988 Oct;255(4 Pt 2):H879-84.

Menyhárt Á, Frank R, Farkas AE, Süle Z, Varga VÉ, Nyúl-Tóth Á, Meiller A, Ivánkovits-Kiss O, Lemale CL, Szabó Í, Tóth R, Zölei-Szénási D, Woitzik J, Marinesco S, Krizbai IA, Bari F, Dreier JP, Farkas E. Malignant astrocyte swelling and impaired glutamate clearance drive the expansion of injurious spreading depolarization foci. *bioRxiv*. 2020; 10.1101/2020.10.02.324103.

Misonou, H., 2010. Homeostatic regulation of neuronal excitability by K(+) channels in normal and diseased brains. *Neuroscientist* 16, 51-64.

Mody I, Lambert JD, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1987 Mar;57(3):869-88.

Momjian-Mayor I, Baron JC. The pathophysiology of watershed infarction in internal carotid artery disease: review of cerebral perfusion studies. *Stroke*. 2005 Mar;36(3):567-77.

Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 1998 Jul 9;394(6689):192-5.

Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sué M, Kracht L, Hashemi P, Bhatia R, Yoshimine T, Dreier JP, Dunn AK, Graf R. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain*. 2010 Jul;133(Pt 7):1994-2006.

Peixoto NL, Fernandes de Lima VM, Hanke W. Correlation of the electrical and intrinsic optical signals in the chicken spreading depression phenomenon. *Neurosci Lett*. 2001 Feb 16;299(1-2):89-92.

Pietrobon, D., Moskowitz, M.A., 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 15, 379-393.

Phillis JW and Ochs S. Excitation and depression of cortical neurones during spreading depression. *Exp Brain Res* 1971; 12: 132–149.

Richter F, Lütz W, Eitner A, Leuchtweis J, Lehmenkühler A, Schaible HG. Tumor necrosis factor reduces the amplitude of rat cortical spreading depression in vivo. *Ann Neurol*. 2014 Jul;76(1):43-53.

Risher WC, Ard D, Yuan J, Kirov SA. Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra. *J Neurosci*. 2010 Jul 21;30(29):9859-68.

Sadeghian H, Lacoste B, Qin T, Toussay X, Rosa R, Oka F, Chung DY, Takizawa T, Gu C, Ayata C. Spreading depolarizations trigger caveolin-1-dependent endothelial transcytosis. *Ann Neurol*. 2018 Sep;84(3):409-423.

Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., Soininen, H., 2011. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* 34, 3-11.

Schiefecker AJ, Beer R, Pfausler B, Lackner P, Broessner G, Unterberger I, Sohm F, Mulino M, Thome C, Humpel C, Schmutzhard E, Helbok R. Clusters of cortical spreading depolarizations in a patient with intracerebral hemorrhage: a multimodal neuromonitoring study. *Neurocrit Care*. 2015 Apr;22(2):293-8.

Schneiderman B, Isaacson RL, Van Hartesveldt C. The effects of spreading depression on penicillin-induced epileptiform activity in rat brain. *Epilepsia*. 1972 Sep;13(5):675-97.

Sesti, F., 2016. Oxidation of K(+) channels in aging and neurodegeneration. *Aging Dis* 7,130–135.

Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, Toledo Y, Hildesheim R, Grinvald A Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron*. 1999 Dec;24(4):791-802.

Simpson, J.E., Ince, P.G., Lacey, G., Forster, G., Shaw, P.J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., Wharton, S.B., Function, M.R.C.C., Ageing Neuropathology Study, G., 2010. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* 31, 578-590.

Slovin H, Arieli A, Hildesheim R, Grinvald A. Long-term voltage-sensitive dye imaging reveals cortical dynamics in behaving monkeys. *J Neurophysiol*. 2002 Dec;88(6):3421-38.

Somjen, G.G., 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096.

Sun, X.L., Hu, G., 2010. ATP-sensitive potassium channels: a promising target for protecting neurovascular unit function in stroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 243-252.

Takano T, Tian GF, Peng W, et al. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci* 2007; 10: 754–762.

Takizawa T, Qin T, Lopes de Morais A, Sugimoto K, Chung JY, Morsett L, Mulder I, Fischer P, Suzuki T, Anzabi M, Böhm M, Qu WS, Yanagisawa T, Hickman S, Khoury JE, Whalen MJ, Harriott AM, Chung DY, Ayata C. Non-invasively triggered spreading depolarizations induce a rapid pro-inflammatory response in cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020 May;40(5):1117-1131.

Tang YT, Mendez JM, Theriot JJ, Sawant PM, López-Valdés HE, Ju YS, Brennan KC. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol*. 2014 Nov 15;112(10):2572-9.

Terry RD, Katzman R. Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging*. 2001 May-Jun;22(3):347-8; discussion 353-4.

Tottene, A., Conti, R., Fabbro, A., Vecchia, D., Shapovalova, M., Santello, M., van den Maagdenberg, A.M., Ferrari, M.D., Pietrobon, D., 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61, 762-773.

van den Maagdenberg, A.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L.A., Cesetti, T., van de Ven, R.C., Tottene, A., van der Kaa, J., Plomp, J.J., Frants, R.R., Ferrari, M.D., 2004. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41, 701-710.

Van Harreveld A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem*. 1959 Feb;3(4):300-15.



- Van Harrevelt A, Stamm JS. Spreading cortical convulsions and depressions. *J Neurophysiol.* 1953 Jul;16(4):352-66.
- Varga DP, Menyhárt Á, Pósfai B, Császár E, Lénárt N, Cserép C, Orsolits B, Martinecz B, Szlepák T, Bari F, Farkas E, Dénes Á. Microglia alter the threshold of spreading depolarization and related potassium uptake in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020 Jan 27;271678X19900097.
- Varga DP, Szabó Í, Varga VÉ, Menyhárt Á, M Tóth O, Kozma M, Bálint AR, Krizbai IA, Bari F, Farkas E. The antagonism of prostaglandin FP receptors inhibits the evolution of spreading depolarization in an experimental model of global forebrain ischemia. *Neurobiol Dis.* 2020b Apr;137:104780.
- Verkhatsky, A., Zorec, R., Rodriguez, J.J., Parpura, V., 2016. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* 26, 74-79.
- Vinogradova LV, Koroleva VI, Bures J. Re-entry waves of Leao's spreading depression between neocortex and caudate nucleus. *Brain Res.* 1991 Jan 4;538(1):161-4.
- 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 Mar 4;85(5):1117-31.
- Watson SN, Lee JR, Risling TE, Hermann PM, Wildering WC. Diminishing glutathione availability and age-associated decline in neuronal excitability. *Neurobiol Aging.* 2014 May;35(5):1074-85.
- Yanni SE, Barnett JM, Clark ML, Penn JS. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Nov;50(11):5479-86.