

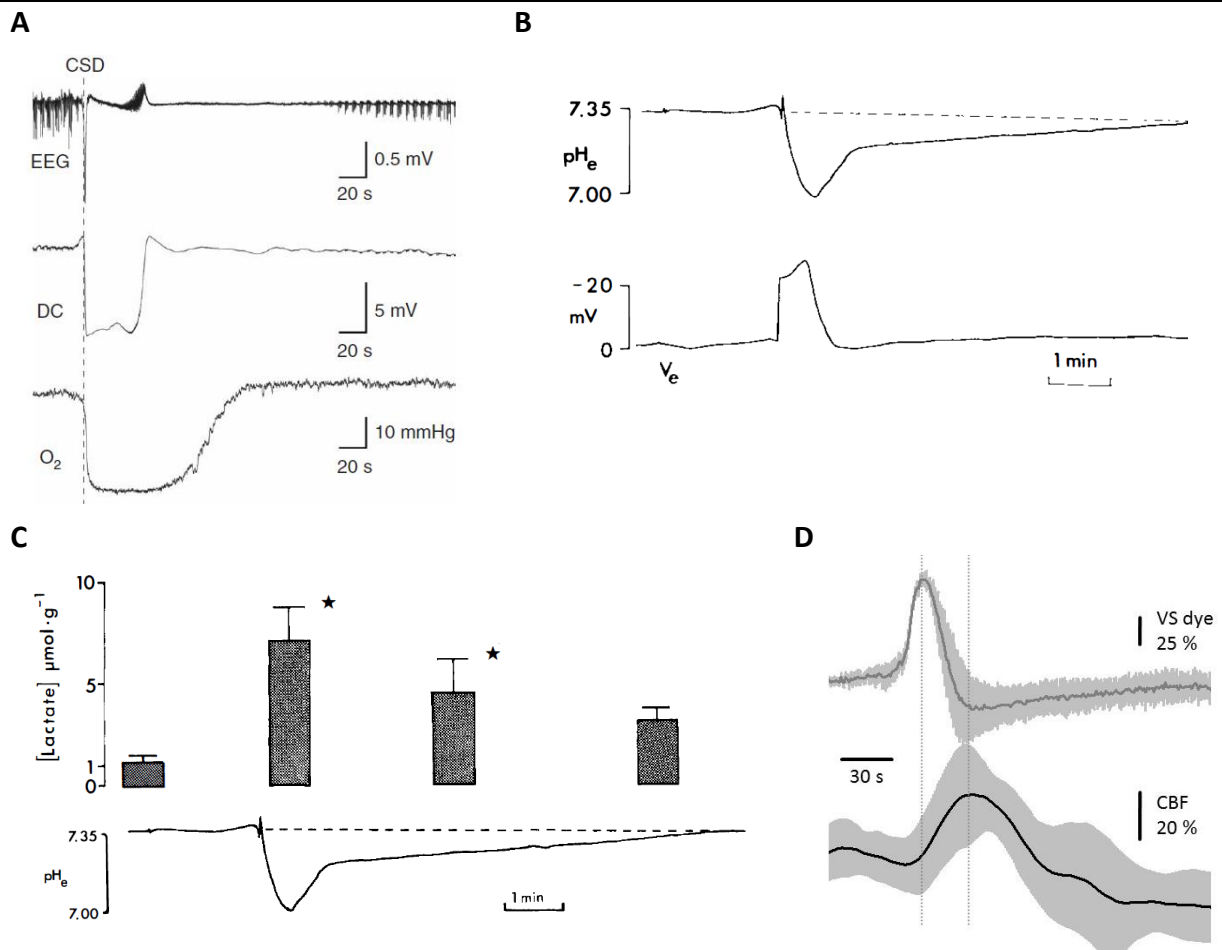
## Oláh László professzor kérdéseire, megjegyzéseire adott válaszok

Hálásan köszönöm Professzor Úrnak munkám gondos bírálatát, eredményeink méltatását és támogató véleményét. Köszönöm, hogy kérdései rámutattak a disszertációm több, vélhetően alaposabb magyarázatot igénylő pontjára.

Feltett kérdéseire, megjegyzéseire a következőkben válaszolok:

1. Elnézést kérek, ha maradtak a dolgozatban elütések vagy elírások. A Word helyesírás ellenőrzését többször is lefuttattam a dolgozaton de valószínűleg elhagyott olyan hibákat, amelyek bár a szöveggörnyezettől idegenek, a helyesírás ellenőrző szempontjából valószínűleg értelmezhető szavak.
2. Köszönöm az időtengellyel kapcsolatos észrevételt. A 4.1.5-ös ábrán az SD letörő és feltörő szárának meredeksége, az azok közötti eltérés valóban szembetűnőbb lenne nagyobb időbeli felbontás ábrázolása mellett. Elfogadom, hogy az ábrának önmagában is informatívnak kell lennie, mentségemre az szolgál, hogy a meredekségekre vonatkozó releváns információ a 4.1.1. táblázatban számszerűen is szerepel.
3. Az általunk kifejlesztett és felhasznált képkalkoló eljárásokkal valóban az SD és a hozzá társuló keringési és metabolikus változások váltak láthatóvá. Az „infarktus időbeli és térbeli növekedésének” követése eredeti céljaink egyike volt (még 2007-ben), amelyet úgy kívántunk megvalósítani, hogy a feszültségfüggő festéket és a pH függő festéket egy preparátumban együttesen alkalmazzuk. A feszültségfüggő festék jelezte volna az SD-kezt, és a pH függő festék adott volna információt a szöveti metabolikus krízis mélységéről, jelezve az infarktus kialakulását az SD függvényében. Az iszkémiás zónák pH alapú elkülönítésének megalapozottságát későbbi közlemények is alátámasztják: az agyszöveti pH változásai a klinikumban amid proton transzfer MRI képkalkotással váltak láthatóvá, és egyben alkalmazhatóvá a penumbra elkülönítésére fokális stroke esetén (Harston et al., 2015; Leigh et al., 2018).  
Tizenegy kísérletet végeztünk 2008-ban a két festék kombinációjával, de azóta az anyagból nem született publikálható egység az optikai jelek bonyolult korrekciója miatt (a jelfeldolgozási kihívásokról a disszertáció 4. fejezetében esik szó). Azóta jelentős tapasztalatot gyűjtöttünk az optikai jelfeldolgozás terén. Az Opponens észrevételétől indítva így most újból lehetőség nyílik a kísérletek átfogó értékelésére, és az eredeti célkitűzés megvalósítására.
4. A kérdés ismételtlen felhívja a figyelmet a fiziológiás neurovaszkuláris csatolás és az SD-re adott hemodinamikai válasz közötti különbségre. Az SD-t követő áramlási válasz első, hiperémiát megelőző komponense egy változó mértékű tranzienis hipoperfúzió (2.2.2. ábra), melynek időtartama 5-30 s között változik (Ayata és Lauritzen, 2015). A 6.3. fejezetben vizsgáltuk a hipoperfúzióval kapcsolatos kérgi arterioláris vazokonstrikció és az SD-vel járó extracelluláris  $K^+$  felhalmozódás viszonyát. Azt figyeltük meg, hogy a vazokonstrikció kezdete időben egybeesett az SD-t jelző  $[K^+]_e$  emelkedés csúcsával. Az érösszehúzóds kezdete lényegében 1-3 másodperces késéssel jelentkezett az SD kezdetéhez képest (6.3.3. ábra). Az SD-hez köthető hemodinamikai válasz késése ilyen értelemben tehát egyezik a szomatoszenzoros ingerlésre adott funkcionális hiperémia késésével, azonban a hemodinamikai válasz lefutásából adódóan az SD esetén a válasz első eleme hipoperfúzió. Az SD-hez társuló domináns hiperémia késését (átlagban 15-20 s; Ayata and Lauritzen, 2015) lefedi az azt megelőző tranzienis hipoperfúzió időtartama.
5. Az SD, mely az agyban ismert legnagyobb metabolikus változást okozza, aerob és anaerob anyagcsere folyamatokat is indukál (Ayata és Lauritzen, 2015). Oxigén bioszenzorral végzett kísérletek arra hívták fel a figyelmet, hogy a szöveti  $pO_2$  az SD-vel jelentősen, 20 Hgmm-t meghaladó mértékben, 23-30 Hgmm-ről 2-3 Hgmm-re csökken. A kísérletekben a szöveti hipoxia az SD után 0,5-3 s késéssel jelentkezett, és megközelítőleg 2 percig állt fenn (1. ábra, A panel), ami megfelel az SD-t kísérő szöveti acidózis időbeli lefutásának (Takano et al., 2007). Az SD-vel kapcsolatos szöveti acidózis kialakulása és a szöveti laktát-felhalmozódás csúcsa továbbá időben közel egybeesik az SD-t jelző DC potenciál-kitéréssel (1. ábra, B-C panel) (Mutch és Hansen, 1984), melyet a hiperémia 15-20 s késéssel követ (1. ábra, D panel).

Mindezek alapján az feltételezhető, hogy az anaerob folyamatok valószínűleg a hiperémia kialakulása előtt indulnak meg. A hiperémia létrejöttét részben a metabolikus krízis indukálja. A hiperémia és az ezzel járó „hiperoxia” (Ayata és Lauritzen, 2015) teremtheti meg a feltételeket ahhoz, hogy a metabolikus krízis rendeződjön. Az egér az SD-t követő CBF és metabolikus változások tekintetben jelentősen eltér a patkánytól, erre a Bíráló 16. kérdésére adott válaszában térek ki.

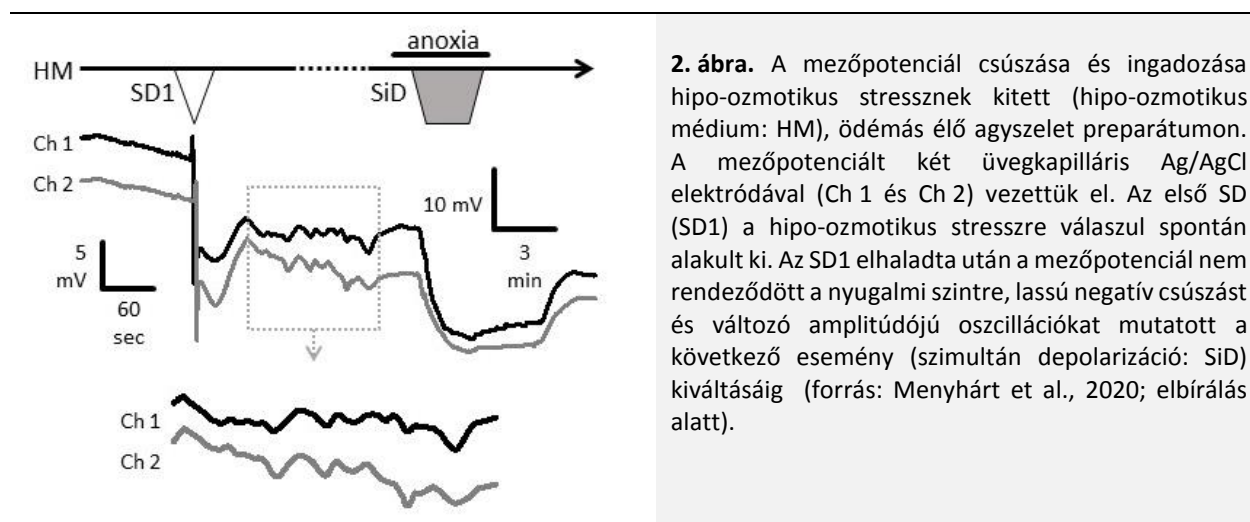


1. ábra. A szöveti oxigén tenzió, az anaerob metabolizmus és az agyi perfúziós változások időbeli viszonya az SD függvényében. A, Az oxigén bioszenzorral monitorozott szöveti parciális oxigén tenzió (O<sub>2</sub>) változása az SD-t jelző EEG depresszióhoz és negatív DC kitéréshez viszonyítva (forrás: Takano et al., 2007). B, Az SD-hez társuló szöveti acidózis időbeli lefutása az SD-t jelző negatív DC kitéréshez viszonyítva (forrás: Mutch and Hansen, 1984). C, Az SD-vel kapcsolatos szöveti laktát-felhalmozódás maximuma az acidózis csúcsával jó megegyezést mutat (forrás: Mutch and Hansen, 1984). D, Az SD-t (VS dye) követő perfúziós változások (CBF) hiperémiás komponense az SD-t 15-20 s-os késéssel követi (saját felvételek: feszültségfüggő festék – VS dye – fluoreszcencia-intenzitás; lézer interferencia kontraszt analízissel nyert agyi perfúziós változás – CBF; átlag±szórás, n=6).

6. Köszönöm az észrevételt, valóban a 4.3.4. ábrára történt az utalás.
7. A „remote MCAO” modell mára valóban szélesebb körben elterjedt. Kísérleteinkben a disztális MCAO alkalmazása mellett szólt az érelzárás során a fej rögzíthetőségén túl az a körülmény is, hogy technikailag viszonylag könnyen kivitelezhető, illetve iszkémiát elsősorban a kéregben eredményez, és a striátumot nem érinti. Az optikai képalkotáshoz a kérgi iszkémia kialakítását elegendőnek és megfelelőnek találtuk. Ismereteim szerint a „remote MCAO” módszer használatával 2015 óta jelennek meg közlemények (Burrows et al., 2015; Sutherland et al., 2016; Szalay et al., 2016). A mi disztális MCAO alkalmazásával készült munkánk ezeket a közleményeket nyolc évvel megelőzte.

8. Igen elvégeztük a releváns kontroll kísérleteket. Trepanációkat végeztünk, de MCAO-t nem hoztunk létre. Az elektrokoagulációt helyettesítve azonban nem érintettük meg a disztális MCA környezetét. Az ilyen típusú kísérletben nem tapasztaltunk SD eseményt. A kontroll kísérleteink azonban sajnos nem alkalmasak arra, hogy eldöntsük, a korai SD-k valóban az MCA környezetének mechanikai ingerlésére jöttek-e létre.
9. Az RH1838 fluoreszcenciájának fakulása rövid időtartamra nézve (<30 min) lineáris, így a fakulás meredekségével és tengelymetszetével korrigálható. A hemodinamikai változókra nézve a gerjesztő fény és emittált fluoreszcencia elnyelésére szükséges korrigálni. A korrekció a Beer-Lambert törvény figyelembe vételével és Monte Carlo szimuláció alkalmazásával valósítható meg (Sun et al., 2011). Bár az RH1838 fluoreszcens jel korrekciójára irányuló törekvés lényeges, megjegyzendő, hogy a korrigálatlan fluoreszcenciaintenzitás-változás is hűen jelzi az SD-k időbeli és térbeli megjelenését, terjedését a nyers felvételeken is (pl. a dolgozat 5.1.5. ábrája).
10. Az 5.1.5. ábrán nyers, korrigálatlan RH1838 fluoreszcencia-intenzitás görbéket tüntettem fel. Az artefaktumok kiszűréséhez és a fluoreszcens jel korrekciójához hemodinamikai változók párhuzamos felvétele is szükséges. A kísérletsorozat a többkomponensű képalkotó rendszerünk kidolgozását megelőzte, csak az RH1838 jelet rögzítettük. Az alapvonal csúszása a perfúzió változásaival, a hemoglobin szaturációjának mértékével függhetett össze; ilyen esetben a csúszás nem a mezőpotenciál változását, hanem a hemodinamikai paraméterek folytonos változását jelezi, így mi műtermékként kezeltük. Az ilyen típusú kísérletek is sarkalltak bennünket arra, hogy később a hemodinamikai modalitásokat beépítsük a képalkotásba.

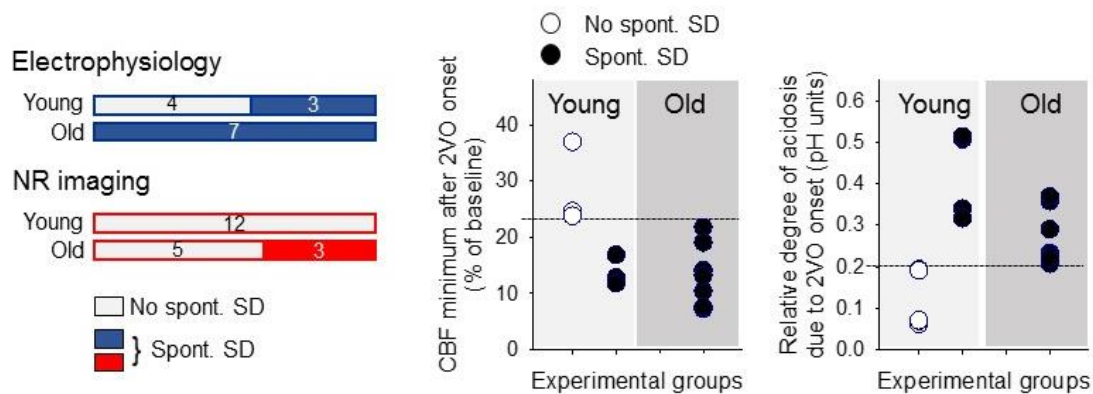
Az idén közlésre előkészített, legfrissebb munkáink alapján visszatekintve azt is elképzelhetőnek tartom, hogy az RH1838 fluoreszcencia pozitív irányú csúszása a szövet ödémásodása következtében mutatkozott. Ozmotikus stressznek kitett, ödémás, élő agyszelet preparátumokban azt tapasztaltuk, hogy az első elhaladó SD-t követően a mezőpotenciál instabillá vált, annak alapvonala ingadozott, fokozatosan negatív irányba csúszott (2. ábra). Ha az RH1838 fluoreszcencia-intenzitásának pozitív csúszása ezzel a jelenséggel függött össze, az biológiai jelnek, valós potenciál-változásnak lenne megfeleltethető.



**2. ábra.** A mezőpotenciál csúszása és ingadozása hipo-oszmotikus stressznek kitett (hipo-oszmotikus médium: HM), ödémás élő agyszelet preparátumon. A mezőpotenciált két üvegapilláris Ag/AgCl elektróddal (Ch 1 és Ch 2) vezettük el. Az első SD (SD1) a hipo-oszmotikus stresszre válaszul spontán alakult ki. Az SD1 elhaladta után a mezőpotenciál nem rendeződött a nyugalmi szintre, lassú negatív csúszást és változó amplitúdójú oszcillációkat mutatott a következő esemény (szimultán depolarizáció: SiD) kiváltásáig (forrás: Menyhárt et al., 2020; elbírálás alatt).

11. A megjegyzéssel teljes mértékben egyetértek, a mikroembolizációk multi-infarktus demenciában valóban egymástól eltérő időben, a kísérleteinkben vizsgálnál jóval hosszabb időskálán következnek be. A kísérleteink az egyes mikroembolizációkat követő események jellemzésére alkalmasak.
12. A kétoldali a. carotis communis okklúzió után a fiatal állatokban ritkán jelenik meg spontán SD (ezért alkalmaztunk vérlebocsátást az 5.3. fejezetben bemutatott kísérletekben), az idős állatokban azonban

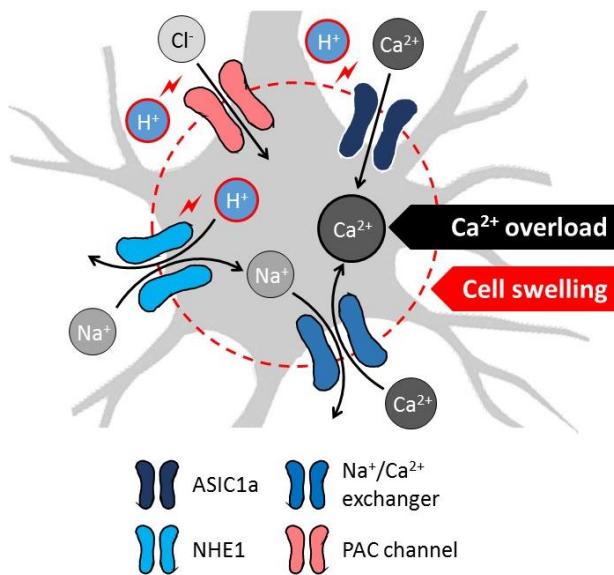
gyakrabban szembesültünk vele. A pH alapú képalkotással végzett kísérletsorozatunkban a szokottnál többször regisztráltunk az a. carotis communis elzárás után spontán SD-t, így ebben a tanulmányban részletesen is értékeltük a spontán SD kialakulásához kedvező körülményeket. Azt állapítottuk meg, hogy az a. carotis communis okklúziót követő percekben abban az esetben alakul ki spontán SD, ha az előidézett iszkémia jelentős: a kérgi perfúzió az alaphoz képest 25 % alá esik, a szöveti savasodás mértéke pedig a 0,2 pH egységet meghaladja (3. ábra). Eredményeink alátámasztják azt a nézetet, hogy az SD létrejöttéhez egy metabolikus „supply demand mismatch” küszöb elérése szükséges (von Bornstädt et al., 2015).



**3. 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 elzárását 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).

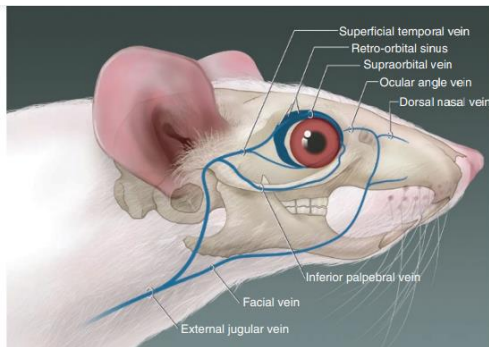
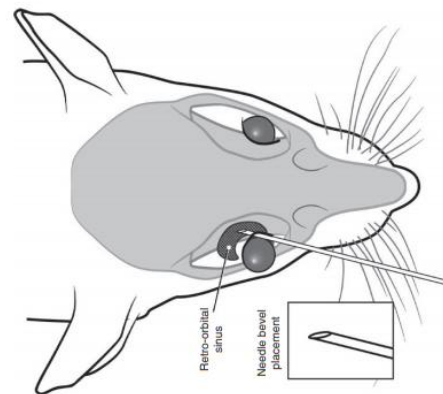
13. Ahogy a Bíráló megjegyzi, az a. carotis communis okklúzió utáni áramlásesés kísérleteink során nem volt egységes. Bár rendszeresen Sprague-Dawley patkányokat használtunk, a patkányok különböző beszállítóktól származtak. Ennél lényegesebb eltérés azonban az, hogy az 5.3. fejezetben bemutatott kísérletek esetén műtéti cérnát öltöttünk az a. carotis communis-ok alá, és a cérna elhúzásával értünk el érelzáródást. A cérna túlzott megfeszítése az ér elmeszesését okozhatta, így a kísérletező óvatosságán múlt, mennyire erősen húzta el az ert. Az óvatosabb és biztonságosabb megközelítés valószínűleg nem eredményezett 100 %-os okklúziót. Ezt a bizonytalanságot oldottuk fel később azzal, hogy horgász damilból és elektromos kábel szigetelőből „okklúder” készítettünk, amelyre az ér nagyobb felszínén feküdt fel. Az ér alá fűzött „okklúder” határozott elhúzása így nem szakította el a nyaki verőeret, ezért bizottsággal létre lehetett hozni a teljes érelzárást. Az 5.4 és 7.4. fejezetekben leírt kísérleteket már ezzel a megoldással végeztük.
14. Az iszkémiával fellépő szöveti acidózis és neuron pusztulás kapcsolatát számos friss közlemény taglalja. A metabolikus acidózis okozta idegsejt pusztulás ioncsatornák és antiporterok működéséhez köthető, melyet a  $H^+$  ion koncentrációja modulál (4. ábra). Az „acid-sensing ion channel 1a” (ASIC1a) nem-szelektív, proton-függő, kation csatorna a neuronokon. Az ASIC1a-t az extracelluláris tér pH csökkenése aktiválja (Wemmie et al., 2006; Leng et al., 2014). Az aktivált ASIC1a-n a membránpotenciáltól függetlenül  $Ca^{2+}$  áramlik a sejtbe, mely hozzájárul a  $Ca^{2+}$ -indukálta iszkémiás sejtpusztuláshoz (Xiong et al., 2004; Yermolaieva et al., 2004; Mari et al., 2010). Az ASIC1a aktiválásához az NMDA receptorok ingerlése is hozzájárul, mert az NMDA receptor aktivitása  $Ca^{2+}$ /calmodulin-függő protein kináz II-n keresztül foszforilálja, és ezzel aktiválja az ASIC1a-t (Gao et al., 2005). A fokális iszkémia rágcsláló MCAO modelljében az ASIC1a gátlása neuroprotektívnek bizonyult (Xiong et al., 2004). Az intracelluláris acidózis a neuronok sejtthártyáján a  $Na^+/H^+$  antiporter 1-es izoformáját („ $Na^+/H^+$  exchanger isoform 1”, NHE1) is stimulálja (Leng et al., 2014). Az NHE1 működésének serkentése iszkémia

során az antiporter foszforilálásán (ERK/p90<sup>RSK</sup> enzimátikus útvonal) keresztül valósul meg (Manhas et al., 2010). Az NHE1 fokozott működése során a H<sup>+</sup> eltávolításával párhuzamosan nagyobb mennyiségű Na<sup>+</sup> lép a sejtekbe, ami víz beáramlását, sejtduzzadást, citotoxikus ödémát okoz (Kintner et al., 2010). A sejten belül felszaporodó Na<sup>+</sup> továbbá a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter működését megfordítja a Na<sup>+</sup> eltávolítása céljából. A kipumpált Na<sup>+</sup>-ért cserébe az antiporter Ca<sup>2+</sup> vesz fel, ami fokozza a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> felhalmozódást (Luo et al., 2005), és az ezzel kapcsolatos sejtkárosító kaszkádokat (Leng et al., 2014). Az NHE1 genetikai kiütése vagy farmakológiai gátlása kísérletes iszkémia modellekben csökkentette az infarktus méretét és az apoptotikus sejtpusztulás mértékét (Luo et al., 2005; Wang et al., 2008; Kang et al., 2020). Végül egy új típusú proton-aktivált Cl<sup>-</sup> csatornának („proton-activated Cl<sup>-</sup> channel”, PAC csatorna) is acidotoxikus szerepet tulajdonítottak (Yang et al., 2019). A savas kémhatásra nyíló csatornán Cl<sup>-</sup> áramlik az idegsejtekbe. A Cl<sup>-</sup> áramot követő vízmozgás sejtduzzadást, majd annak következményeként onkotikus sejthalált okoz (Wang et al., 2007). A PAC csatorna genetikai kiütése neuron kultúrában és a rágcsáló MCAO iszkémia modellben részleges neuroprotekciónak ért el (Yang et al., 2019; Osei-Owusu et al., 2020). Tekintve, hogy az iszkémia fellépésével a penumbra jellemezhető enyhe szöveti acidózist az SD jelentősen elmélyíti, valószínű, hogy a felsorolt sejtszintű folyamatok beindításában fontos és meghatározó szerephez jut.



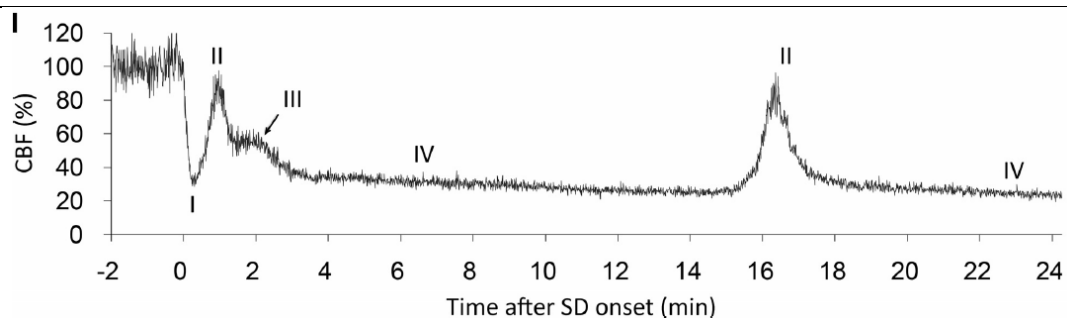
**4. ábra.** Az acidotoxicitás lehetséges sejtszintű mechanizmusai iszkémiás stroke esetén intracelluláris Ca<sup>2+</sup> felhalmozódáshoz és sejtduzzadáshoz vezetnek. Az extracelluláris pH csökkenés a neuronális ASIC1a csatornák aktivitásának fokozásával Ca<sup>2+</sup> beáramlást okoz. A sejten belüli savasodás serkenti a H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiportot, melyet a felszaporodott Na<sup>+</sup> eltávolítása követ Ca<sup>2+</sup> felvételéért cserébe. Az ionmozgások végeredményben intracelluláris Ca<sup>2+</sup> felhalmozódáshoz vezetnek. A szöveti acidózis proton aktivált Cl<sup>-</sup> (PAC) csatornákon keresztül a sejtbe Cl<sup>-</sup> beáramlást is indukál. A Na<sup>+</sup> (NHE1) és Cl<sup>-</sup> (PAC csatorna) feldúsulása a sejten belül víz belépését vonja maga után, ami citotoxikus ödéma kialakulásához vezet (forrás: M.Tóth et al., 2020; elbírálás alatt).

15. Elnézést kérek a retro-orbitális injekció módszeréhez szükséges citáció elmaradásáért. A retro-orbitális bejuttatási útvonalat egerekben alkalmazzák a vénák kanülálásának körülményessége miatt. A szem mögött a retro-orbitális szinusz több véna összefolyásának eredménye, a festék injekciója a szemgolyó mögé, ebbe a vénás szinuszba történik. A módszer talán legrészletesebb leírását Yardeni et al. közölte 2011-ben (5. ábra).

**A****B**

**5. ábra.** A retro-orbitális anyagbejuttatási útvonal egérben. **A**, A retro-orbitális szinusz kialakító erek lefutása, a retro-orbitális szinusz anatómiája. **B**, A retro-orbitális injekció sematikus ábrája (forrás: Yardeni et al., 2011).

16. Az egér esetén az első SD-re válaszul kialakuló vazokonstriktió és az SD után fennmaradó oligemia annyira meghatározó mértékű, hogy a következő, 15-30 percen belül kiváltott SD-hez társuló hiperémia csúcsa sem éri el a CBF alapvonalát; a hiperémia relatív (6. ábra). A meghatározó és hosszan fennmaradó vazokonstriktió következtében az egérben az SD a hemoglobinszaturációját, és a szöveti oxigénellátás súlyos zavarát vonja maga után (Yuzawa et al., 2012).



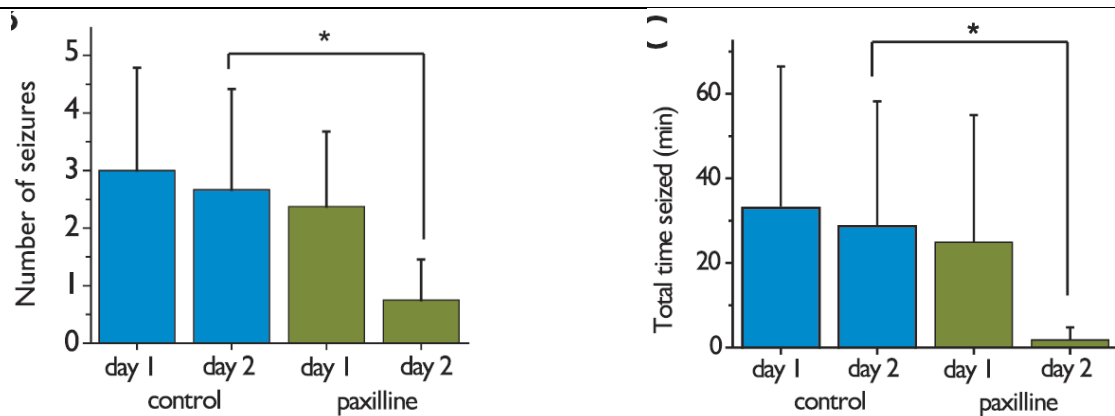
**6. ábra.** A CBF alakulása ismételt SD-k kiváltása esetén egér ép agykérgében. Két, 0 és 15 perc időpontban kiváltott SD-hez kapcsolódó CBF válasz rajzolódik ki. Mindkét hiperémia csúcsa (II) az alapáramlás alatt marad (forrás: Ayata and Lauritzen, 2015).

17. A korrelációs analízist egy adott állatból származó 8 SD-n végeztük el, mert több kedvező feltétel is egyszerre teljesült: (i) Az SD-k kiváltása a kísérlet során progresszíven emelkedő alap  $K^+$  koncentráció mellett valósult meg (2,86-ról 18,08 mM-ra) úgy, hogy a kérgi keringést érelzárás nem akadályozta. A  $K^+$  koncentrációja a fiziológias értékről fokozatosan emelkedett a sérült kéregre jellemző tartományba (Hansen and Zeuthen, 1981), de nem haladta meg a vazokonstriktív küszöböt (20 mM), amit igazolt a CBF alapvonal stabilitása. A perfúzió megtartottsága mellett lehetőségünk nyílt arra, hogy a  $K^+$  SD-re gyakorolt hatását vizsgáljuk anélkül, hogy az iszkémia alatt felszabaduló egyéb mediátorokat is figyelembe kellett volna venni. (ii) Minden vizsgált SD eseményre egységes volt az elektródák/szenzorok geometriája a preparátumban (kísérletről kísérletre apró eltérések adódnak), ami az elvezetett jelek (DC potenciál,  $K^+$  koncentráció, CBF) közötti időbeli összefüggések értékelésének kedvezett; (iii) Az adott körülmények között sikerült annyi SD-t kiváltani ( $n=8$ ), ami a statisztikai analízis alapjául szolgálhatott. A megközelítés minimalizálta az adatok szórását.

Bár a disszertációban nem részleteztem a feltételeket, a dolgozat alapjául szolgáló cikk módszerek részében a megfogalmazott kritériumokat pontosan feltüntettük (Menyhárt et al., 2018).



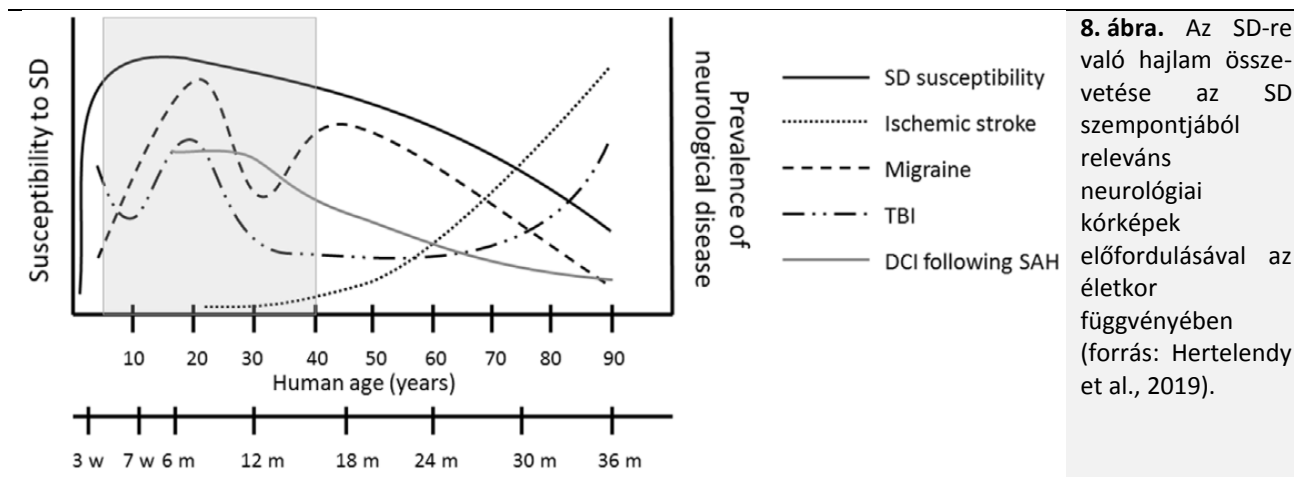
18. A paxillin egy fonalas gombából (*Penicillium paxilli*) származó indol alkaloid toxin, amely növényevőkben a táplálékkal bejutva a cerebellum működéséhez köthető tremort generál (Porter 1995). Kísérletekben szisztémás (i.p.) adagolása ellensúlyozta a pikrotoxinnal vagy pentilén-tetrazollal kísérletesen kiváltott epilepsziás rohamot (7. ábra) tremorra emlékeztető mellékhatás megjelenése nélkül (Sheehan et al., 2009). Ezt a neuronális aktivitás gátlásának tudták be, mert a paxillin kezelést követően a c-fos immunreaktivitás csökkent az agyban. A BK csatornák gátlása iberiotoxinnal (szelektív BK csatorna blokkoló) idegsejt kultúrán is csökkentette az epilepsziás görcsaktivitást (Jin et al., 2000). A BK csatorna blokkolás gátló hatása az epilepsziás görcsaktivitásra különösen releváns, mert az SD és az epilepsziás görcsaktivitás idegéletlenül egymáshoz közel álló jelenségek. Arról nem tudok, hogy agyi iszkémiás kísérletekben a paxillin hatását felmérték volna.



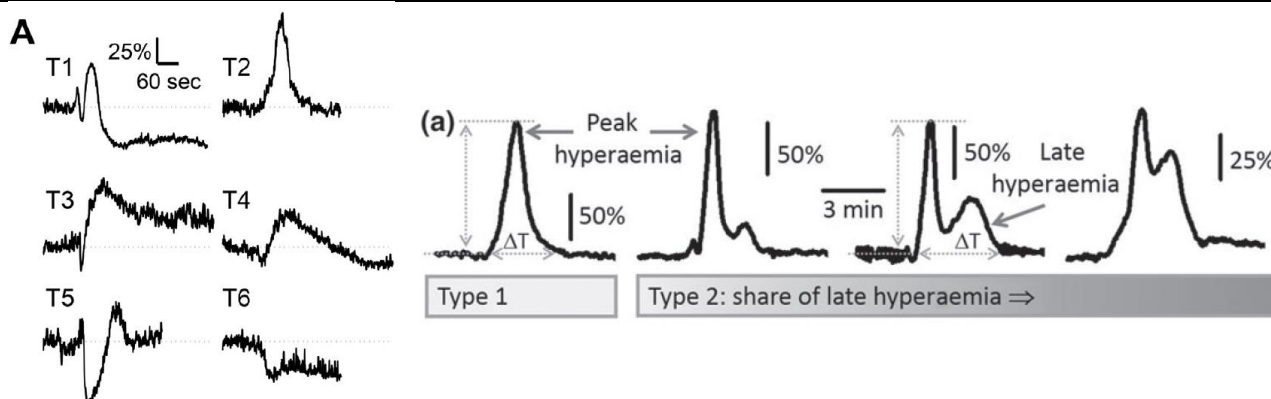
**7. ábra.** A paxillin hatása a farmakológiailag pentilén-tetrazollal kiváltott epilepsziás rohamra (paxillin bejuttatása: i.p.; 2.2 µg/kg dózisban, kalkulált végső *in vivo* szöveti koncentráció: 5 nM) (forrás: Sheehan et al., 2009).

19. A kísérletsorozatban az elektrofiziológiai méréseket és farmakológiai kezeléseket altatott patkányokon illetve patkányokból származó élő agyszelet preparátumon végeztük. A két-foton mikroszkópos vizsgálatokhoz azonban egereket kellett használnunk, mert a patkány méreténél fogva fizikailag nem fér el a mikroszkóp tárgyasztala és az objektívrendszer között. Az SD-hez társuló korai vazokonstriktív vizsgálatára az egér ideális modellnek bizonyult.

20. Köszönöm a helyesbítést. Valóban, a SAH a stroke betegség fiatal felnőttekben leggyakrabban előforduló formája, és a fiatal életkor rizikófaktora a SAH-ot követő másodlagos lézióknak (proximális erek vazospazmusa, kései iszkémiás károsodás). A disszertáció 2.4. fejezetének részét képezhette volna az életkor és az SD koincidenciáját vázlatosan feltüntetető ábra, melyet a vonatkozó közleményben bemutattunk (8. ábra).



21. Köszönöm a megjegyzést, valóban szerencsésebb lett volna árnyaltabban fogalmazni. Saját munkáink kapcsán tettük azt a megfigyelést, hogy különböző altatók használata mellett az SD-t követő korai tranziens hipoperfúzió megjelenésének valószínűsége, mértéke az altató függvényében változott. Izoflurán altatásban az alapáramlás magasabb (nyers, perfúziós egységben kifejezve), erek alaptónusa csökken, az érsimaizom ellazultabb állapotban van. A carotis leszorítás után kiváltott SD-ket patkányban korai hipoperfúzió, majd kisebb relatív amplitúdójú hiperémia követi (9. ábra). Alfa-kloralóz altatásban az alap perfúzió alacsonyabb, az erek bazális tónusa kifejezettebb, az SD-t követő CBF válaszban a korai hipoperfúzió előfordulása ritka, a domináns hiperémia relatív amplitúdója markáns (9. ábra) (Szabó et al., 2019).



**9. ábra.** Az SD-hez társuló CBF válasz elemeinek megjelenése, mértéke, az altatás függvényében, iszkémiás patkánygyban. **A**, Izoflurán altatásban a korai hipoperfúzió átlagban  $37 \pm 17$  s hosszan állt fenn, a hiperémia relatív amplitúdója  $57 \pm 10.1$  %-nak bizonyult (forrás: Menyhárt et al., 2015). **(a)**, Alfa-kloralóz altatásban a korai hipoperfúziót elvértve észleltük, a hiperémia relatív amplitúdóját  $131 \pm 66$  %-nak mértük (forrás: Szabó et al., 2019).

22. Az iszkémia kiváltása során először a dMCAO-t hoztuk létre egy klip felhelyezésével az MCA disztális szakaszára a temporális csonton kialakított kraniotómián keresztül, majd közvetlenül ezután, egy percen belül történt meg a carotis artéria elszorítása is. Nagyon kicsi a valószínűsége, hogy ilyen rövid időn belül prekondicionálás alakuljon ki.

23. A disszertációban bemutatott kísérletek természetesen intenzív csapatmunkát igényeltek. A képző eljárás kidolgozása az Egyesült Királyságban tett 1,5 éves posztdoktori kutatómunka része volt. A bradfordi laboratóriumban gyakorlatilag Tiho Obrenovitch professzor irányításával, Obrenovitch professzorral ketten valósítottuk meg azokat a projekteket, amelyek a disszertáció 4.1, 4.2 és 5.1. fejezeteiben kerültek bemutatásra. Hazatérésemet követően Bari professzor csoportjában folytatódott a kutatás. 2009-2011



között Obrenovitch professzorral együttműködésben, Bere Zsófia PhD hallgatóval dolgoztunk együtt, aki orvosként végzett. Ebből az időszakból származik a disszertáció 5.2., 5.3. és 7.2. fejezetének anyaga. 2013-ban a csoportban három új PhD hallgató (egy orvos és két biológus végzettségű) kezdett, közülük Menyhárt Ákos kollégám, aki azóta a csapat meghatározó poszt doktori kutatója, vette kézbe az elektrofiziológiai rendszer felügyeletét, fejlesztését. Ugyancsak 2013-ban kiegészült a csapat Zölei-Szénási Dániellel, aki fizikusként a képkalkoló rendszer folyamatos fejlesztését és karbantartását végzi. A közös munka a disszertáció 5.4., 6.3., 7.1 és 7.3. fejezeteiben került bemutatásra. A bonyolultabb optikai jelkorrekcióban, elektrofiziológiai jelfeldolgozásban az elmúlt 5 évben Makra Péter fizikus kollégám vállalt fontos szerepet. A csoport az elmúlt tíz év során fokozatosan egyre több tagot számlált, és mára már szerencsére elért egy kritikus tömeget: hét PhD fokozattal rendelkező kutató közül három teljes munkaidőben (biológus végzettségűek), és négyen részmunkaidőben (egy orvos, egy biológus és két fizikus) dolgoznak a projekteken. Jelenleg négy PhD hallgató egészíti ki a csapatot.

Szeged, 2020. október 29.



Dr. Farkas Eszter

## Felhasznált szakirodalom:

Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):953-93.

Burrows FE, Bray N, Denes A, Allan SM, Schiessl I. Delayed reperfusion deficits after experimental stroke account for increased pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015 Feb;35(2):277-84.

Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L, Xu TL. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron.* 2005 Nov 23;48(4):635-46.

Harston GW, Tee YK, Blockley N, Okell TW, Thandeswaran S, Shaya G, Sheerin F, Cellerini M, Payne S, Jezard P, Chappell M, Kennedy J. Identifying the ischaemic penumbra using pH-weighted magnetic resonance imaging. *Brain.* 2015 Jan;138(Pt 1):36-42.

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.* 2019 Jul;127:125-136.

Jin W, Sugaya A, Tsuda T, Ohguchi H, Sugaya E. Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity. *Brain Res.* 2000 Mar 31;860(1-2):21-8.

Kang BS, Choi BY, Kho AR, Lee SH, Hong DK, Jeong JH, Kang DH, Park MK, Suh SW. An Inhibitor of the Sodium-Hydrogen Exchanger-1 (NHE-1), Amiloride, Reduced Zinc Accumulation and Hippocampal Neuronal Death after Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 14;21(12):4232.

Kintner DB, Chen X, Currie J, Chanana V, Ferrazzano P, Baba A, Matsuda T, Cohen M, Orlowski J, Chiu SY, Taunton J, Sun D. Excessive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in disruption of dendritic Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial dysfunction following in vitro ischemia. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):35155-68.

Leigh R, Knutsson L, Zhou J, van Zijl PC. Imaging the physiological evolution of the ischemic penumbra in acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Sep;38(9):1500-1516.

Leng T, Shi Y, Xiong ZG, Sun D. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke? *Prog Neurobiol.* 2014 Apr;115:189-209.

Luo J, Chen H, Kintner DB, Shull GE, Sun D. Decreased neuronal death in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia. *J Neurosci.* 2005 Dec 7;25(49):11256-68.

M. Tóth O, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Farkas E, Ferenc Bari. Tissue acidosis associated with ischemic stroke and spreading depolarization to guide neuroprotective drug delivery. *Biology - Special Issue "Brain Damage and Repair: From Molecular Effects to CNS Disorders"*, 2020; under consideration.

Manhas N, Shi Y, Taunton J, Sun D. p90 Activation contributes to cerebral Ischemic damage via phosphorylation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1. *J Neurochem.* 2010 Sep 1;114(5):1476-86.

Mari Y, Katnik C, Cuevas J. ASIC1a channels are activated by endogenous protons during ischemia and contribute to synergistic potentiation of intracellular Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and acidosis. *Cell Calcium.* 2010 Jul;48(1):70-82.

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

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. *J Exp Med.*, 2020. under consideration; BioRxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.02.324103>.

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 Dec;36(12):3269-3277.

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 Apr 25;7(1):1154.

Osei-Owusu J, Yang J, Del Carmen Vitery M, Tian M, Qiu Z. PAC proton-activated chloride channel contributes to acid-induced cell death in primary rat cortical neurons. *Channels (Austin)*. 2020 Dec;14(1):53-58.

Porter JK. Analysis of endophyte toxins: fescue and other grasses toxic to livestock *J Anim Sci*. 1995 Mar;73(3):871-80.

Sheehan JJ, Benedetti BL, Barth AL. Anticonvulsant effects of the BK-channel antagonist paxilline. *Epilepsia*. 2009 Apr;50(4):711-20.

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 Aug 1;57(3):873-84.

Sutherland BA, Fordsmann JC, Martin C, Neuhaus AA, Witgen BM, Piilgaard H, Lønstrup M, Couch Y, Sibson NR, Lauritzen M, Buchan AM. Multi-modal assessment of neurovascular coupling during cerebral ischaemia and reperfusion using remote middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Jul;37(7):2494-2508.

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 May;176(9):1222-1234.

Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, Fekete R, West BL, Katona G, Rózsa B, Dénes Á. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun*. 2016 May 3;7:11499.

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.

Wang HY, Shimizu T, Numata T, Okada Y. Role of acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in acidosis-induced cell death in human epithelial cells. *Pflugers Arch*. 2007 May;454(2):223-33.

Wang Y, Luo J, Chen X, Chen H, Cramer SW, Sun D. Gene inactivation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 attenuates apoptosis and mitochondrial damage following transient focal cerebral ischemia. *Eur J Neurosci*. 2008 Jul;28(1):51-61.

Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci*. 2006 Oct;29(10):578-86.

Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):687-98.

Yang J, Chen J, Del Carmen Vitery M, Osei-Owusu J, Chu J, Yu H, Sun S, Qiu Z. PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. *Science*. 2019 Apr 26;364(6438):395-399.

Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 27;101(17):6752-7.

Yuzawa I, Sakadžić S, Srinivasan VJ, Shin HK, Eikermann-Haerter K, Boas DA, Ayata C. Cortical spreading depression impairs oxygen delivery and metabolism in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Feb;32(2):376-86.