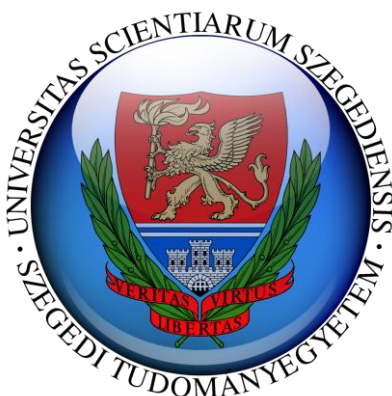


A hidrogén neurovaszkuláris protektív hatásának vizsgálata aszfixiát követően újszülött malacban

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Oláh Orsolya



Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet

Szeged

2015

Bevezetés

A perinatális időszakban a központi idegrendszert érintő hipoxiás-iszkémiás károsodás súlyos következményekkel járhat. A károsodások leggyakoribb klinikai megjelenési formája - az évente mintegy egymillió csecsemőt érintő - hipoxiás-iszkémiás enkefalopátia (HIE), mely a csecsemő halálához vezethet, vagy az esetek jelentős részében súlyos, maradandó idegrendszeri károsodást okoz [1]. Ez utóbbi kiemelkedően nagy terhet ró az érintettek közvetlen környezetére, a társadalomra és az egészségügyi ellátórendszerre. A jelentős orvostechnikai fejlődés ellenére a károsodás pontos ideje és oka gyakran marad felderítetlen, ám kijelenthetjük, hogy leggyakrabban a hipoxémia és az agyi vérátáramlás csökkenése vezet a HIE kialakulásához [2-4].

A reszuscitáció és a klinikailag stabil állapot elérése és fenntartása a HIE akut kezelésének alappillére. Ezek legjelentősebb eleme a megfelelő lélegeztetés és a keringés fenntartása, a megfelelő folyadék- és tápanyagpótlás, valamint a hipertermia elkerülése.

Az elmúlt években a lélegeztetés során használt gázok összetétele is a figyelem középpontjába került. Bebizonyosodott, hogy az 1930-as évektől a megfelelő oxigénellátás eléréséhez rutinszerűen használt 100% oxigéntartalmú gázzal történő lélegeztetés kifejezett mértékben emelte az oxidatív stresszt, ezáltal pedig negatív irányban befolyásolta a HIE kimenetelét [5]. Ennek elkerülése érdekében ma már a reszuscitációra használt gázkeverék oxigéntartalmának a légköri koncentrációra való csökkentése javallt, ha megfelelő oxigénszaturáció fenntartható [6]. A HIE kezelésének másik alappillére a testhőmérséklet kontrollja. A hipertermia bizonyítottan növeli a halálesetek számát, és a súlyos neurológiai károsodások kialakulásának esélyét [7]. Ezzel szemben a hipoxiát-iszkémiát követő néhány órán belül (<6 óra) alkalmazott mérsékelt hipotermia neuroprotektív hatásának bizonyult. Az ennek háttérében álló mechanizmusok valószínűleg magukba foglalják a csökkent metabolikus rátát, az excitotoxikus neurotranszmitterek csökkent felszabadulását, az apoptózis mértékének és a vér-agy gát permeabilitásának csökkenését [8, 9]. Mindezen jótékony hatásoknak köszönhető, hogy az első klinikailag valóban hatékony neuroprotektív terápia - a mérsékelt teljes test hipotermia - az elmúlt években már szélesebb körben alkalmazásra került [10-12].

A HIE vizsgálatára az elmúlt évtizedekben számos állatkísérletes modellt fejlesztettek ki [13-16]. A legelterjedtebbek közé tartoznak a rágcsáló-modellek, elsősorban a könnyű kezelhetőség és a tenyésztés során felmerülő költségek alacsony volta miatt. Ennek ellenére azonban, számos hátrányuk is van, melyek közül lényeges működésbeli eltérésük a humán fiziológiától és patofiziológiától, valamint az újszülött állatok neurológiai fejlettsége, súlya, és mérete, melyek szintén jelentős eltérést mutatnak a humán újszülöttekétől. A kisállatok felhasználása mellett nagy, girenkefál állatmodellek is kialakításra kerültek, mint pl. az újszülött juh, valamint főemlős HIE modellek. Ezek alkalmazása azonban a humán paraméterekkel mutatott nagyobb hasonlóság ellenére jelentős anyagi és etikai akadályokba ütközik. Mindeztől az elmúlt években a perinatális hipoxiás-iszkémiás károsodások vizsgálatára az egyik

legalkalmasabb és szélesebb körben alkalmazható girenkefál állatmodellnek az újszülött malac bizonyult.

Az újszülött malac - mely fajt illetően laboratóriumunk is jelentős tapasztalatokkal rendelkezik - mind anatómiai, mind pedig fiziológiai hasonlóságokat mutat a humán újszülöttekkel, melyek lehetővé teszik a kísérletes eredmények klinikai használatba való átültetését. A hasonlóságok magukba foglalják a születéskori testtömeget, étkezési mintázatot, gasztrointesztinális-, endokrin-, immun- és idegrendszert, a légzési frekvenciát és térfogatot [17]. Mindezek mellett jelentős a genetikai hasonlóság; a sertés fehérjék átlagosan mintegy 60% homológiát mutatnak a humán fehérjékkel, szemben a rágcsálók esetében meghatározott 40%-kal. Az újszülött malac modellben megfigyelt idegsejt-károsodás mintázata hipoxiás-iszkémiás inzultust követően, nagymértékű hasonlóságot mutat a humán újszülöttekben tapasztalhatóval, ezzel alátámasztva a modell HIE vizsgálatában való alkalmazhatóságát [18].

Az agyi véráramlás szabályozásában jelentős szereppel bír az ún. neurovaszkuláris egység, mely a neuronok metabolikus igényeinek megfelelő szöveti perfúzió és tápanyagellátás biztosításáért felelős. Elemeinek - idegsejtek, asztrociták és agyi mikrovaszkuláris sejtípusok – jelentős szerep jut továbbá a vér-agy gát megfelelő működésének fenntartásában, a neuroimmun folyamatokban és a megfelelő érzékelésben. A hipoxiás-iszkémiás károsodás mértékét jelentősen súlyosbíthatja a neurovaszkuláris egység funkciózavara, például a megváltozott cerebrovaszkuláris reaktivitás (CR) az agyszövet hipoperfúziójának fokozódásához vezethet. Az CR-t kísérletes körülmények között valamely vazoaktív stimulus alkalmazása közben a megfelelő agyi terület ereinek képalkotó eljárással történő megfigyelésével határozzák meg. A laboratóriumunk által a neurovaszkuláris egység épségének tesztelésére használt – a pia mater arteriolák dilatációját eredményező - stimulusok a hiperkapnia és az agyfelszínre juttatott NMDA. Ezekkel mind a neuronális, mind pedig a vaszkuláris elemek funkciója jól vizsgálható. A hiperkapnia, az egyik leggyakrabban használt, potens értágító stimulus számos modellben került alkalmazásra. Az újszülött malacban a hiperkapnia-indukálta értágulat kiváltásához ép endotélfunkcióra van szükség, mely jelentős mértékben sérül hipoxiát/iszkémiát követően [19-21]. A neurovaszkuláris funkciók vizsgálatára alkalmazott másik elterjedt módszer a glutamát-agonista NMDA használata, mely közvetlenül az agyfelszínre juttatva piális arteriola tágulatot hoz létre. A tágulatot a neuronális nitrogén-monoxid szintáz aktivációján keresztül hozza létre, a NO szint megemelésével [22-24]. Az NMDA-kiváltotta értágulat ismételt, és hosszabb alkalmazása sem befolyásolja más vazoaktív anyagokra adott válaszkészséget [25, 26], ám maga rendkívül érzékeny a hipoxiás/iszkémiás károsodásra.

A HIE súlyos társadalmi és gazdasági következményei ellenére a hatékony neuroprotektív terápiás stratégiák kialakítása jelentős nehézségekbe ütközik. Mindezekig csak a mérsékelt teljes-test hipotermia bizonyult hatásosnak, ezért egyre sürgetőbb egyéb neuroprotektív szerek felfedezése,

melyek akár önmagukban, akár a hipotermiával együtt alkalmazva fejthetik ki neuroprotektív hatásukat. A HIE kialakulását és patofiziológiáját tekintve az egyik leginkább támadható pont az oxidatív stressz lehetne.

Az elmúlt években előtérbe került a molekuláris hidrogén, mely a hidroxil és peroxinitrit gyökökre szelektíven antioxidáns tulajdonsággal bír, ennél fogva, ideális szer lehet a reaktív szabadgyökök fokozott felszabadulásával járó kórképekben [27].

Célkitűzés

A neurovaszkuláris egység funkciójának változásait a perinatális aszfixiát követő akut periódusban (≤ 4 óra) már számos tanulmányban vizsgálták, azonban a megváltozott CR formájában jelentkező neurovaszkuláris diszfunkció hosszabb távú alakulásáról lényegében nem rendelkezünk érdemi információkkal.

A disszertációban tárgyalt vizsgálatok a következő célok megvalósítását tűzték ki:

- 1) Megvizsgáljuk, hogy a molekuláris hidrogén befolyásolja-e az újszülött malac fiziológiás paramétereit, az agykérgi vérátáramlást, illetve hatással van-e neurovaszkuláris funkcióra valamint az agyszövet mikroszkópos szerkezetére normoxiás körülmények között.
- 2) Megvizsgáljuk, hogy a perinatális aszfixiát követő akut reventilációs időszakban a hidrogén befolyásolja-e a kialakuló neurovaszkuláris károsodás mértékét, illetve az agykérgi ciklooxygenáz-2 (COX-2) expressziót.

Az akut időszakban végzett vizsgálatokból származó pozitív eredmények arra ösztönöztek bennünket, hogy a vizsgálatokat kiterjesszük a perinatális aszfixiát követő túlélés 24 órájáig, hiszen ebben az időszakban már jellemzően előfordulnak a HIE másodlagos tünetei, a másodlagos energiaválság és az epileptiform görcstevékenység is. Számos metodikai újítással lehetővé vált számunkra, hogy

- 3) Megvizsgáljuk a neurovaszkuláris károsodás mértékét az aszfixiát követő 24 órában.
- 4) Megvizsgáltuk, hogy a hidrogén befolyásolja-e a megváltozott CR-t 24 órával az aszfixia után.
- 5) Megfigyeljük a hidrogén neuroprotektív hatását az agyi elektromos aktivitás és a neuropatológiai elemzés segítségével

A laboratórium technikai fejlesztéseinek keretein belül lehetőség nyílt továbbá arra, hogy (6) megvizsgáljuk a CR-vizsgálatok során alkalmazott stimulusok hatását az eddig megfigyelt pia arteriola átmérő változások mellett az agykérgi perfúzióra is.

Módszerek

Kísérleti csoportok

Kísérleteinket újszülött malacokon végeztük (1-2 napos, testtömeg: 1,5-2,5 kg, n=78) a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti és Etikai Bizottsága által jóváhagyott kísérleti protokollok alapján. Az állatokat a kísérleti protokollnak megfelelően 8 kísérleti csoportba osztottuk: 4 csoport állatain az aszfixia hatásait a HIE kialakulásának akut fázisában vizsgáltuk (1: szobalevegővel lélegeztetett időkontroll, n=9, 2: 2% hidrogén tartalmú szobalevegővel lélegeztetett időkontroll, n=7, 3: szobalevegővel lélegeztetett aszfixiás, n=8, 4: 2% hidrogén tartalmú szobalevegővel lélegeztetett aszfixiás, n=7), 3 csoport állatain az aszfixia hatásait a HIE kialakulásának szubakut fázisában vizsgáltuk (5: szobalevegővel lélegeztetett időkontroll, n=9, 6: szobalevegővel lélegeztetett aszfixiás, n=9, 7: 2% hidrogén tartalmú szobalevegővel lélegeztetett aszfixiás, n=9), a 8. kísérleti csoportban pedig az agyi perfúzió (8: LASCA, n=20) vizsgálatát végeztük.

HIE modellek

Akut HIE modell: Az anesztézia indukciójához Na-tiopentált (45mg/kg ip.) használtunk, melyet α -kloralóz (30-40mg/kg iv.) adásával tartottunk fenn. A femorális artériába és vénába kanült helyeztünk el, melyen keresztül a vérnyomásmérés, vérvétel, gyógyszerek beadása és folyadékpótlás történt. Az állatokat mesterségesen lélegeztettük, és testhőmérsékletüket a fiziológiás tartományban (38-39°C) tartottuk. Az előkészítést követően megtörtént az érreaktivitás mérése, melyet az aszfixia követett. Az aszfixiát a lélegeztetés 10 perces felfüggesztésével idéztük elő. A 10 perc elteltével a lélegeztetést a kísérleti csoportnak megfelelő gázkeverékkel folytattuk. Az aszfixiát követő 1 óra elteltével ismételten elvégeztük az érreaktivitás mérését, majd folytattuk a lélegeztetést a megfigyelési időszak (4 óra) leteltéig. A megfigyelést eutanáziával és szövettani mintavétellel zártuk.

Szubakut HIE modell: Az altatást Na-tiopentállal (45mg/kg ip.) végeztük. A kísérleti állatokat tracheotómián keresztül intubáltuk, és szobalevegővel mesterségesen lélegeztettük. A jobb combvénába és a juguláris vénába helyezett kanülon keresztül a vérgázok és vércukor ellenőrzése, valamint folyadékpótlás (5% glükóz, 0,45% NaCl, 2-5ml/kg/h) és gyógyszerek adagolása történt. Az anesztéziát morfin és midazolam telítő (100 μ g/kg és 250 μ g/kg) és fenntartó (10 μ g/kg/h és 250 μ g/kg/h) dóziséval biztosítottuk. Az aszepszist kiegészítendő, 12 óránként antibiotikumok (penicillin 50mg/kg, gentamycin 2,5mg/kg) adása történt. Az előkészítést követően az állatokat nyitott újszülött inkubátorban helyeztük el. A következő fiziológiás paramétereket monitorizáltuk: maghőmérséklet (38 \pm 0,5°C), oxigén szaturáció (90-100%), szívfrekvencia, EKG, artériás vérnyomás. Az agyi elektromos aktivitás későbbi értékelése érdekében aEEG került rögzítésre. Az aszfixiát a lélegeztetés 8 perces felfüggesztésével idéztük elő, melyet 4 órán keresztül a csoportnak megfelelő gázkeverékkel történő lélegeztetés követett. A 24 órás túlélési periódust követően meghatároztuk a

CR-t, majd az agyat az a.carotis communisokba vezetett katétereken keresztül perfundáltuk szövettani mintavétel céljából.

A CR vizsgálata zárt koponyaablak/intravitális videomikroszkópia segítségével

A CR vizsgálatához a bal parietális csontba a dura mater eltávolítása után zárt koponyaablakot ültettünk be. A pia mater arteriolák (~100µm) érátmérő-változásainak meghatározását intravitális videomikroszkópiával végeztük.

A CR méréséhez a következő vasoaktív stimulusok kerültek alkalmazásra: 1) gradált hiperkapnia (5 és 10% CO₂ belélegeztetése), 2) NMDA (10 és 100µM), 3) noradrenalin (NA; 10 és 100µM) és 4) Na-nitroprusszid (SNP; 1 és 10µM). A farmakonokat mesterséges cerebrospinális folyadékban juttattuk az agykéreg felszínére. A hiperkapnia és az NMDA hatását 5-5 percig, a NA és a SNP hatását pedig 3-3 percig folyamatosan detektáltuk, a stimulusra adott maximális választ az alapátmérő százalékos változásaként fejeztük ki.

Neuropatológia

Az idegsejtek károsodását 8 különböző agyi régióban hematoxin-eozinnal festett metszetek vizsgálata alapján ítéltük meg. Az idegsejt-károsodást két független vizsgáló értékelt, a teljes neuronszám százalékos arányában adta meg és eredményeiket átlagoltuk. A vizsgálatok során egyes csoportok esetében COX-2 és MAP-2 immunhisztokémia is történt.

Lézer folt interferencia kontraszt analízis (LASCA)

Az agykérgi perfúzió és az agyi érátmérő összehasonlítása céljából LASCA-t végeztünk. Ennek során zárt koponyaablak került behelyezésre, melyet lézerdióda polarizált infravörös közeli fényével világítottunk meg, és a visszaverődő fényt monokróm kamerával detektáltuk. Az így vizualizált terület perfúziójának stabilizálódása után agykérgi áramlásváltozás vizsgálatot végeztünk.

Statisztikai analízis

A csoportok közötti eltérések kimutatásához egy- vagy két szempontos variancia analízist végeztünk, *post hoc* tesztként a Student-Newman-Keuls tesztet alkalmaztuk. Amennyiben az adatokon a paramterikus tesztek nem voltak értelmezhetőek, nem-paraméteres próbaként Kruskal-Wallis variancia analízist Dunn-féle *post hoc* teszttel, vagy a Mann-Whiney-U tesztet végeztük. P<0.05-t tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

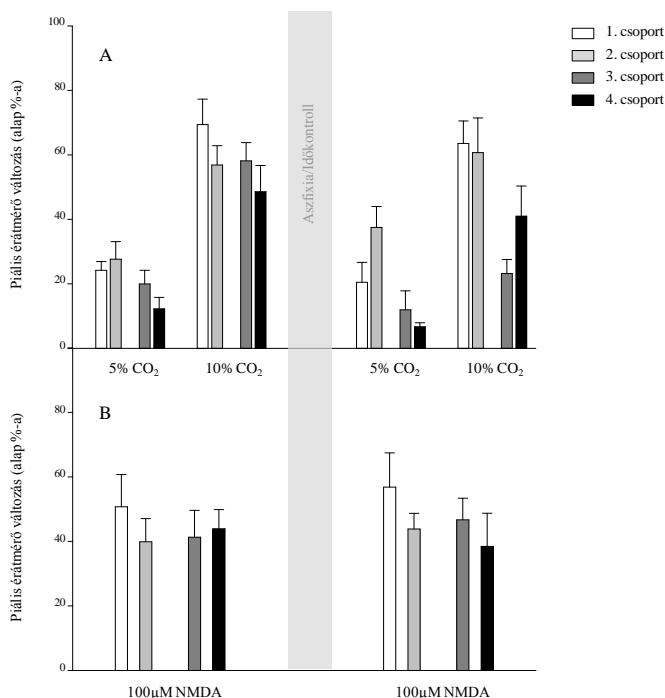
Eredmények

A vitális paraméterek aszfixia előtti alap értékeiben - mint a vérnyomás, szívfrekvencia, testhőmérséklet és vérgáz értékek - nem találtunk szignifikáns eltérést sem az akut, sem a szubakut HIE modell csoportjai között.

A hidrogén neurovaszkuláris protektív hatásai az akut HIE modellben

Az aszfixia szignifikáns hipoxiát, hiperkapniát és acidózist okozott. A reventiláció során a pCO₂ 30 percet követően az időkontroll csoportoknak megfelelő értékekre csökkent a hidrogén-lélegeztetett csoportban, míg a szobalevegő-lélegeztetett csoport értékei magasabbak voltak. Az aszfixia szignifikáns artériás középnyomás és agykérgi vérátáramlás-csökkenést is okozott. A lélegeztetés visszaállítását követő első órán belül a vérnyomás az alapot megközelítő értékeken stabilizálódott, ennek megfelelően a CR vizsgálatok a csoportok nem különböztek szignifikánsan sem egymástól, sem az aszfixia előtti alaptól.

Az érreaktivitás-vizsgálatok során a gradált hiperkapnia azonos mértékű, szignifikáns pCO₂ emelkedést és pH csökkenést okozott mind a 4 kísérleti csoportban. Ennek megfelelően, az aszfixia előtt minden csoportban hasonló mértékű, szignifikáns érátmérő-növekedés volt megfigyelhető. Az aszfixiát követően azonban a szobalevegővel lélegeztetett csoportban ez a vazodilatáció szignifikánsan csökkent, ellentétben a hidrogén-lélegeztetett csoporttal, ahol a válasz megtartott volt (1A ábra).



1. ábra: Piális arteriolák érátmérő-változásai akut CR vizsgálat során

HIE modell négy csoportjának mindegyikében kimutatható volt a COX-2 immunpozitivitás mind az idegsejtekben és a mikroerekben egyaránt. A neuronális COX-2 expresszió minden kortikális

Az NMDA szignifikáns vazodilatációt okozott az aszfixiát megelőző és az azt követő vizsgálatok során, minden kísérleti csoportban (1B ábra).

A kezeletlen állatokban tapasztalt idegsejt károsodás mértéke elhanyagolható volt. Az időkontroll csoportban alacsony, mindössze 1-4%-os neuronpusztulást tapasztaltunk a lélegeztetéstől függetlenül. Ezzel ellentétben az aszfixia szignifikáns károsodást okozott a 3. csoportban, és mindössze mérsékelt neuronpusztulást tapasztaltunk a hidrogénnel lélegeztetett 4. csoportban. Az akut

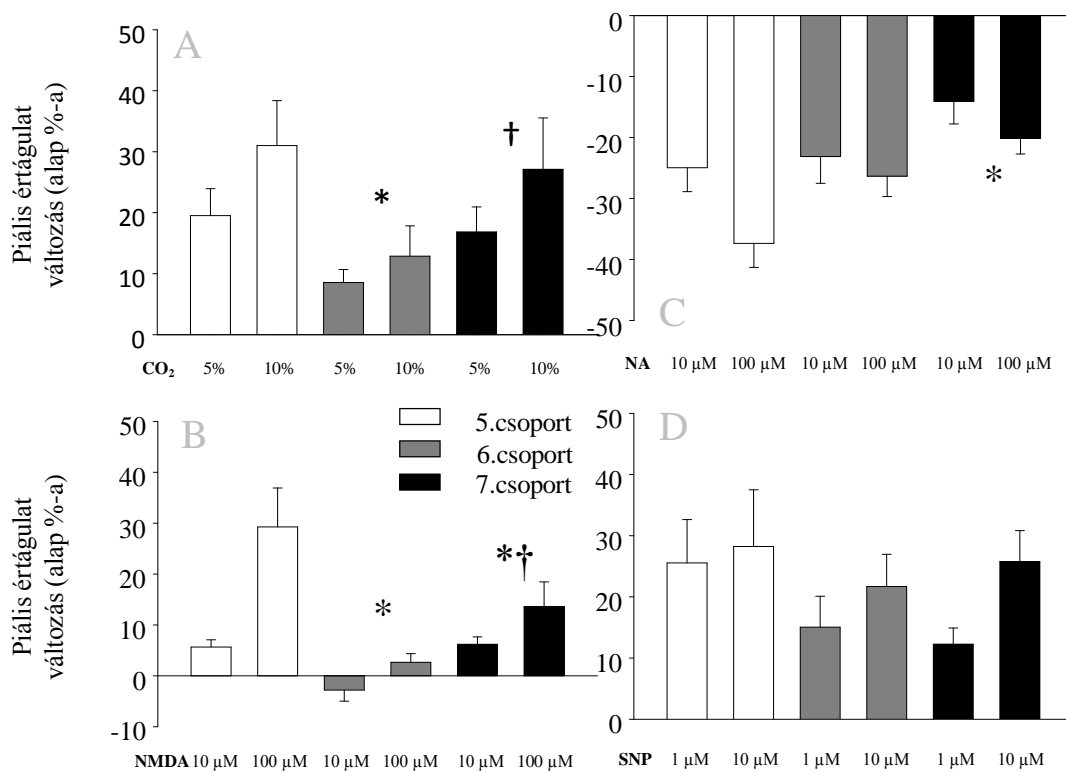
lebenyben, és azok minden rétegében megfigyelhető volt, kifejezett halmozódást mutatva a III-as és V-ös réteg piramis sejtjeiben. Bár a csoportok között nem volt szignifikáns különbség, megfigyeltük, hogy a frontális és parietális kéregterületeken a COX-2 pozitivitást mutató idegsejtjeinek száma kétszerese volt a temporális és az okcipitális kérgi területeken meghatározott sejtek számának. A COX-2 immunpozitivitást mutató sejtek festődésének mértéke, melyet hárompontos skálán értékeltünk (1+, 2+, 3+), azonban arányaiban megegyezett minden területen (1+: ~50%, 2+: ~35%, 3+: ~15%).

A hidrogén neurovaszkuláris protektív hatásai a szubakut HIE modellben

Az időkontroll csoport vitális paraméterei (szívfrekvencia, vérnyomás, vérgázok, maghőmérséklet és oxigén szaturáció) a megfigyelés teljes ideje alatt az élettani tartományon belül voltak, az aEEG pedig folyamatos aktivitást mutatott. Az aszfixia 1-2 percen belül az aEEG izoelektromossá válását, valamint súlyos hipoxiát, hiperkapniát, hipotenziót és bradikardiát okozott, mely az aszfixia teljes időtartama alatt fennállt. A reventilációs periódus kezdeti szakaszában (2-3 óra) ezek az értékek rendeződtek, és szignifikáns különbséget az időkontroll csoporttól nem mutatattak. Az aEEG aktivitás jelentős egyéni variabilitással, de lényegében valamennyi állatban rendeződött a túlélési periódus végéig.

A CR vizsgálata során a hiperkapnia itt is jelentős értágulatot okozott az időkontroll csoportban, ami az akut kísérletekben megfigyeltekkel lényegében azonos mértékű volt. A hiperkapniára adott érválasz a hidrogén-lélegeztetett aszfixiás csoportban intakt volt, míg a szobalevegővel lélegeztetett aszfixiás csoportban lényegében megszűnt a stimulussal szembeni CR (2A ábra). Az NMDA szintén a korábbi akut vizsgálatokhoz hasonló mértékű, dózis-függő pia arteriola vazodilatációt hozott létre az időkontroll csoportban. Az aszfixia mindkét csoportban jelentősen károsította az NMDA-kiváltotta CR-t; a szobalevegővel lélegeztetett csoportban gyakorlatilag a válaszkészség teljes megszűnését tapasztaltuk, ugyanakkor a hidrogén-lélegeztetés hatására egy csökkent mértékű, de szignifikáns érválaszt rögzítettünk (2B ábra).

A NA vazokonstriktor ill. a SNP vazodilatátor hatását az aszfixia szignifikánsan nem károsította, ugyanakkor a NA-ra adott csökkent konstriktor válasz volt megfigyelhető a hidrogén-lélegeztetést követően (2C és D ábra).

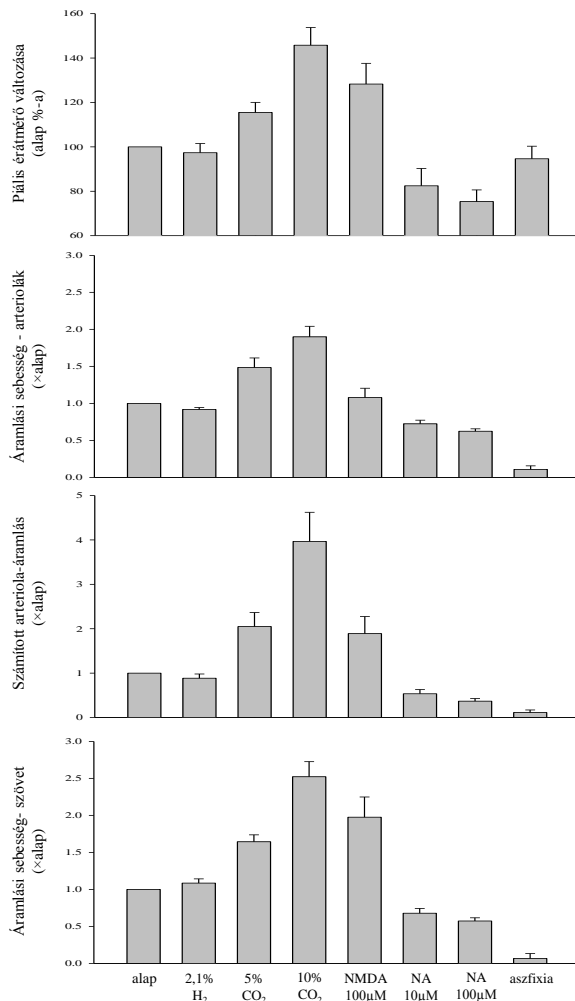


2. ábra: Piális arteriolák érátmérő-változása CR vizsgálata során az aszfiát követő 22. órában

A szövettani elemzés során az időkontroll csoportban enyhe perivaszkuláris ödémán kívül nem tapasztaltunk jelentős hisztopatológiai eltérést. Ezzel szemben az aszfixia jelentős neuronális károsodást okozott a szobalevegővel lélegeztetett csoportban, míg a károsodás a hidrogén-lélegeztetés hatására számos megfigyelt terület esetében nem mutatott szignifikáns eltérést az időkontroll csoporttól, vagy szignifikánsan alacsonyabb volt a szobalevegő-lélegeztetett csoportban tapasztalt mértéktől. A szövettani vizsgálatok során MAP-2 festést, és denzitás vizsgálatot végeztünk, mely során a csoportok között jelentős eltérést nem tapasztaltunk.

Az agykérgi perfúziós válaszok vizsgálata LASCA segítségével

A lézer-folt interferencia kontraszt analízis (LASCA) segítségével összehasonlítottuk a különböző stimulusokra adott agyi érátmérő változásokat a kortikális vérátáramlás változásaival (3. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a hidrogén-lélegeztetés az érátmérőhöz hasonlóan a kérgi parenchyma vérátáramlását sem befolyásolta. Az általunk használt vazoaktív stimulusok (hiperkapnia, NMDA,



3. ábra: LASCA-val mért áramlási sebesség-, perfúzió- és érátmérő –változások

NA) a korábban megfigyelt érátmérő változásokat hozták létre a pia mater arteriolákban. Az arteriolákban azonban megfigyelhettük, hogy a hiperkapnia az áramlási sebesség fokozódását, a NA pedig az áramlási sebesség csökkenését hozza létre, míg az NMDA az arteriolákban az áramlási sebességet nem változtatta meg számottevően. A kérgi parenchymában megfigyelt perfúzióváltozások egyszerre tükrözték a pia mater arteriולה átmérőjében és a véráramlás sebességében bekövetkezett változásokat. Megvizsgáltuk továbbá az aszfixia hatására bekövetkező változásokat is, melyből kitűnt, hogy az érátmérő változatlansága mellett áramlási sebesség-csökkenés alakul ki, mely ennek megfelelően az agyszövet parenchymájának súlyos hipoperfúzióját – iszkémiáját okozza.

Diszkusszió

A HIE vizsgálatára használt számos állatkísérletes modell közül az egyik leggyakrabban alkalmazott girenkefál állatmodell az újszülött malac. Laboratóriumunk jelentős tapasztalati háttérrel rendelkezik a rövid túlélésű malac HIE modellek alkalmazásában az elmúlt 15 év során. A jelentős eredmények ellenére az elvégzett kísérletek követési időszaka maximálisan az inzultust követő 4-6 órára korlátozódhatott. A megfigyelési idő kiterjesztését akadályozta a megfelelő instrumentáció és az aseptikus műtét feltételeinek hiánya. Ismerve a reoxigenizáció 12-24. órájában jelentkező ún. másodlagos energiahány jelenségét, feltételezhető volt, hogy a HIE kialakulása nem ér véget az inzultust követő néhány órás időszakban, így az aszfixia neurovaszkuláris következményeinek árnyaltabb, pontosabb megismerése indokoltá tette a követési idő meghosszabbítását.

A kiterjesztett megfigyelési idő megkövetelte a korábban használt modell módosítását is. Ennek megtervezésekor az elsődleges iránymutatást a perinatális intenzív terápiás ajánlások szolgáltatták [28]. A felhasznált eszközök és gyógyszerek mellett a műteti előkészítés protokollját is módosítottuk, valamint bővítettük és pontosítottuk a vitális paraméterek monitorozását is. Előkísérletek alapján vált világossá, hogy a maghőmérséklet (38.5 °C) szoros kontrollja mellett a korábban használt 10 perces aszfixia túl magas letalitással jár, így az aszfixia időtartamát 8 percre kellett csökkentenünk.

Vizsgálataink elsődleges célja volt a perinatális aszfixia hatására kialakuló neurovaszkuláris funkciózavar vizsgálata rövid illetve kiterjesztett megfigyelési idővel. A megfigyeléseinket egy régóta használt vizsgálati módszerrel végeztük; zárt koponyaablak beültetésével és intravitális videomikroszkópiával.

A megfelelő idegi működés a megfelelő agyi vérellátástól függ. A szöveti igényeket folyamatosan kielégítő agyi perfúzióról az agyi rezisztenciaerek lokális kaliberváltozásai gondoskodnak a különböző környezeti és belső hatásoknak megfelelően. A kielégítő szöveti perfúzió egyik kulcsa az erek reakciókészsége olyan élettani stimulusokra, mint pl. a megemelkedett széndioxid-koncentrációra vagy különböző neurotranszmitterekre ill. humorális mediátorokra. Ez a reaktivitás megfigyelhető az érátmérő-változások követésével, ezzel vizsgálhatóvá téve az erek és a neurovaszkuláris egység állapotát, illetve egy esetlegesen neuroprotektív terápia hatásosságát hipoxiás/iszkémiás stresszt követően [29, 30].

Az agyi perfúzió változásának és az agyi erek reaktivitásának kimutatására számos kísérleti módszer került meghatározásra. Ezek egyike a piális arteriolák átmérőváltozásainak vizsgálata különböző vazoaktív stimulusokra, melyet évtizedek óta használnak számos állatkísérletes modellben. Az agykérgi artériák és arteriolák felelnek az agy vaszkuláris rezisztenciájának 50-60%-áért, ezzel

alátámasztva jelentős szerepüket a lokális perfúziós nyomás és az agyi vérátáramlás meghatározásában [31, 32].

A piális arteriolák reaktivitásának meghatározására használt leggyakoribb stimulus a hiperkapnia. A 10%-os CO₂-tartalmú gáz lélegeztetése jelentős tágulatot okoz, mely 200-300%-kal növeli a lokális vérátáramlást [33, 34]. Ennek a kvantitatív módszerekkel is kimutatott emelkedésnek a korábban lézer-Doppler áramlásméréssel végzett vizsgálataink során mindössze töredékét sikerült detektálnunk [35]. A tapasztalt jelentős különbség is megerősítette olyan módszer bevezetésének szükségességét, mellyel a lézer-Dopplerhez hasonlóan szemikvantitatív módon tudjuk mérni az agykérgi perfúziót, de annál érzékenyebben tudjuk detektálni a vérátáramlás-változások mértékét. A LASCA-val kapott eredményeink jól tükrözik a kvantitatív módszerekkel kapott véráramlás-változások eredményeit. Mindemellett a LASCA lehetőséget ad az arteriolák kaliberváltozásainak vizsgálatára is, így mérési eredményeink alátámasztották, hogy a piális arteriolák átmérőváltozásai viszonylag nagy pontossággal tükrözik a kérgi vérátáramlás változásait.

A különböző vaszkuláris stimulusokra adott válaszreakció változása nem csak a neurovaszkuláris egység egészének, de egyes elemeinek állapotát is jól tükrözheti, ha a vizsgálat során használt stimulusok megválasztása során figyelembe vesszük azok hatásmechanizmusát. Kísérleteinkben az aszfixia jelentős mértékben csökkentette a hiperkapniára adott tágulatot egy órával az aszfixiát követően. Ez a károsodás azonban nem volt megfigyelhető a hidrogénnel lélegeztetett állatoknál, ami az endotél károsodásának elmaradását mutatja. Az ép endotélfunkció elengedhetetlen a vér-agy gát megfelelő működésének fenntartásában, és a további neuronális károsodás megelőzésében is [36]. Az NMDA-kiváltotta vazodilatáció pedig egy, a neuronok által közvetített komplex érreakció, melynek eredményeként az idegsejtekből felszabaduló NO a vaszkuláris simaizom relaxációját okozza [23, 37]. Az érválasz érzékeny a globális iszkémiára, és 50%-kal csökken az iszkémiás inzultust követő első óra végére [29, 38]. Ezzel ellentétben, jelen vizsgálatainkban nem tapasztaltunk jelentős eltérést a kontroll csoport eredményeitől egy órával aszfixiát követően. Ennek oka feltehetően, hogy az általunk alkalmazott aszfixia enyhébb károsodást okozott az intrakrainális nyomásfokozással létrehozott globális agyi iszkémiánál.

A perinatális aszfixiát követő 6-24 órában megfigyelhető jelenség az ún „másodlagos energiahány” (second energy failure), amely tovább súlyosbíthatja a neuronális károsodást, súlyos szövődmények (apnoe, epileptiform görcsrohamok) forrása, és jelentősen ronthatja a végleges kimenetelt [39]. A túlélési idő 24 órára való kiterjesztésével módunk nyílt új megfigyeléseket tenni a neurovaszkuláris diszfunkció mértékéről ebben a periódusban. Az eredmények összehasonlíthatóságának érdekében a kiterjesztett túlélési idejű állatok kísérleti protokollja a CR vizsgálatkor megegyezett az akut szakban végzett korábbi kísérletekkel [23, 40]. Ennek köszönhetően,

a várakozásainknak megfelelően a piális érátmérőváltozások nagysága az akut kísérletekben tapasztaltakkal azonos mértékű volt. Az akut kísérletekkel ellentétben azonban mind az endotélium-függő hiperkapnia-kiváltotta, mind pedig a neuron-függő NMDA-kiváltotta értágulat jelentős mértékben károsodott, ezzel bizonyítva a neuronális és a vaszkuláris elemek érintettségét egy nappal az aszfixiát követően. A hidrogén-lélegeztetés a hiperkapnia esetében teljes, NMDA esetében részleges javulást eredményezett az aszfixiás károsodást követően. Tekintve, hogy a hidrogént a reventiláció első négy órájában alkalmaztuk, a protektív hatása ebben az időszakban kihangsúlyozza az akut szakban keletkező reaktív oxigéngyökök szerepét a másodlagos energiahiány, és az annak részeként kialakuló neurovaszkuláris károsodás patomechanizmusában.

A neuronkárosodás mértékének meghatározására az agy számos területén szövettani vizsgálatot is végeztünk. A 10 perces aszfixiát követően jelentős, a korábbi kísérleteinkben tapasztaltakkal megegyező mértékű [30] neuronális károsodás volt megfigyelhető, amelyet a hidrogén-lélegeztetés szignifikáns mértékben csökkentett. Megfigyeléseinkkel elsőként bizonyítottuk a hidrogén neuroprotektív hatását nagy állatmodellben, amely a más kutatók által megfigyelt, egyéb állatmodellekben tapasztalt neuroprotektív hatás mértékének megfelelt [27, 41].

A szubakut megfigyelési időszak végeztével a rövidebb aszfixiás periódusnak megfelelően kissé enyhébb neuronkárosodást tapasztaltunk. Az agyszövet strukturális integritásának vizsgálatára további immunhisztokémiai vizsgálatot is végeztünk. A Mikrotubulus Asszociált Protein (MAP-2)-egy neuronális struktúrfehérje, a MAP-2 immunfestődés csökkenése jó markere a neuronális károsodásnak. A MAP-2 immunreaktivitás denzitometriás elemzése nem mutatott jelentős eltérést az egyes csoportok között, mely arra utal, hogy a károsodott neuronok struktúrájának lebomlása még nem ért el szignifikáns mértéket.

Az aszfixiát követő reventiláció jelentős reaktív oxigéngyök-felszabadulással jár, melynek elsődleges forrásai az ekkor aktiválódó enzimek. Az egyik ilyen enzim a ciklooxygenáz-2 (COX-2), mely felelős a hipoxiát/iszkémiát követő prosztanoid-felszabadulásért és szuperoxid-anion termelésért. A megnövekedett prosztanoid koncentráció súlyosbíthatja a KIR neuronális és vaszkuláris károsodását, de tanulmányok azt is bizonyítják, hogy az emelkedett COX-2 expresszió védő hatással is lehet [42]. A képződött szuperoxid-anion jelentős mértékben járul hozzá az oxidatív stresszhez iszkémiát követően, így COX-2 aktivitás a neurovaszkuláris diszfunkciót is nagy mértékben befolyásolja [43, 44].

A COX-2 expressziójának emelkedéséért felelős mRNS szint-növekedés már 0,5-2 órával az aszfixiás inzultus után tapasztalható [45, 46]. Négy órával az aszfixiát követően nem tapasztaltunk jelentős eltérést a COX-2 expresszióban a csoportok között, azonban jelentős eltérés mutatkozott az egyes agyterületeken található COX-2 pozitív neuronok számában minden csoportban. Már korábban

is vizsgálták az agyi COX-2 expressziót malacban, ám az agykérgi eredmények mindössze a parietális kéregből származtak, és nem vizsgálták az egyes agykérgi területek közötti különbségeket [47]. Míg a szubkortikális régiókban és a kisagyban alacsonynak találtuk a COX-2 immunreaktív neuronok számát, a kérgi területeken magas arányban mutattunk ki COX-2-t expresszáló neuronokat. Ez azt is mutathatja, hogy az egyes területek COX-2 függő oxidatív stressznek való kitettsége egy hipoxiás inzultus során más-más lehet. Érdekes fordított korreláció áll fenn tehát a regionális COX-2 expresszió és a lokális alap vérátáramlás között: a szubkortikális struktúrák alacsony COX-2 expressziójához magasabb, a kérgi magas COX-2 expresszióhoz alacsonyabb vérátáramlás társul [48].

Széles körben elfogadott, hogy az újszülöttkori hipoxiás/aszfixiás károsodások patomechanizmusában legnagyobb szerepe az oxidatív stressznek van. Annak ellenére, hogy számos a reaktív oxigéngyökök előállítására alkalmas enzim található az újszülött szervezetben, az antioxidáns mechanizmusok éretlenek, így jelentős az oxidatív stressznek való kitettség. A reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációt, DNS-károsodást és fehérjekárosodást okozhatnak, NO-val kapcsolódva pedig rendkívüli oxidáló hatással rendelkező peroxinitritet képezhetnek [49, 50]. Ezek alapján a károsodások csökkentésére a reaktív oxigéngyökök kialakulásának megakadályozása vagy mennyiségének csökkentése lehet a leghatásosabb stratégia. Fontos az is, hogy a potenciálisan neuroprotektív anyag jelen legyen a gyökök kialakulásának helyén, hogy maximális hatást fejthessen ki.

A molekuláris hidrogén esetében az egyik ideális alkalmazási mód lehet a reszuszcitációra használt gázkeverékkel történő adagolás, melynek kiegészítése 2% H₂ gázzal jelentősen csökkenthetné az idegi károsodást a reoxigenizáció periódusában. Ez a mennyiség biztonságos, és 20ng/ml koncentrációt eredményez a perifériás vérben, mely elegendő lehet a megfelelő terápiás hatáshoz [27].

A hidrogén-lélegeztetés az általunk is igazolt neuroprotektív hatáson kívül számos egyéb központi idegrendszeri betegség esetén bizonyult hatásosnak állatkísérletes modellekben, így például kognitív zavarok, agyi atrófia és szubarahnoidális vérzést követően [51, 52]. A molekuláris hidrogén protektív hatásának teljes spektruma még nem került felderítésre, és nem igazolt, hogy mindössze egyes reaktív oxigén metabolitok neutralizációjára korlátozódik. A HIE szubakut időszakában végzett megfigyelésink bizonyítják, hogy a hidrogén által kifejtett neuroprotektív hatás nem függ a közvetlen jelenlététől, hiszen a meghosszabbított túlélés során az alkalmazás és a hatásának vizsgálata között 20 óra telt el. Eredményeink alapján a molekuláris hidrogén neuroprotektív hatásainak további vizsgálata mindenképpen indokolt, hiszen a klinikai gyakorlatban protokollszerűen használt terápiák sorába egyszerűen lenne beilleszthető a korai reoxigenizációval együtt alkalmazható hidrogén-lélegeztetés, az újszülöttek újraélesztésére használt gázkeverékébe kevert alacsony koncentrációjú hidrogén segítségével.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Domoki Ferencnek a közös munkánk során tanúsított türelméért, a támogatásáért és biztatásért, valamint, hogy nem csak mentorként, hanem barátként is segítette tudományos gondolkodásom fejlődését. Köszönet illeti Prof. Bari Ferencet, aki megismertette és megszerettette velem a tudományos munkát, valamint Tóth-Szűki Valériát, a hétköznapi problémákban nyújtott szakmai és baráti segítségéért. Végül, köszönetet szeretnék mondani családomnak és barátaimnak, akik mindig támogattak.

A disszertáció alapját képező közlemények

1. Domoki F, **Olah O**, Zimmermann A, Nemeth I, Toth-Szuzi V, Hugyecz M, Temesvári P and .Bari F (2010) Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr Res* 68: 387-392. IF: 2,803
2. **Olah O**, Nemeth I, Toth-Szuzi V, Bari F and Domoki F (2012) Regional Differences in the Neuronal Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in the Newborn Pig Brain. *Acta Histochem Cytochem* 45: 187-192. IF: 1,48
3. Domoki F, Zolei D, **Olah O**, Toth-Szuzi V, Hopp B, Bari F and Smausz T (2012) Evaluation of laser-speckle contrast image analysis techniques in the cortical microcirculation of piglets. *Microvasc Res* 83: 311-317. IF: 2,929
4. **Olah O**, Toth-Szuzi V, Temesvari P, Bari F and Domoki F (2013) Delayed neurovascular dysfunction is alleviated by hydrogen in asphyxiated newborn pigs. *Neonatology* 104:79-86. IF: 2,573

Hivatkozások

1. Bryce, J., et al., *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1147-52.
2. Ferriero, D.M., *Neonatal brain injury*. N Engl J Med, 2004. **351**(19): p. 1985-95.
3. Grow, J. and J.D. Barks, *Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts*. Clin Perinatol, 2002. **29**(4): p. 585-602, v.
4. Perlman, J.M., *Brain injury in the term infant*. Semin Perinatol, 2004. **28**(6): p. 415-24.
5. Ten, V.S. and D. Matsukevich, *Room air or 100% oxygen for resuscitation of infants with perinatal depression*. Curr Opin Pediatr, 2009. **21**(2): p. 188-93.
6. Saugstad, O.D., T. Rootwelt, and O. Aalen, *Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study*. Pediatrics, 1998. **102**(1): p. e1.
7. Laptook, A., et al., *Elevated temperature after hypoxic-ischemic encephalopathy: risk factor for adverse outcomes*. Pediatrics, 2008. **122**(3): p. 491-9.
8. Gunn, A.J., *Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia*. Curr Opin Pediatr, 2000. **12**(2): p. 111-5.
9. Gunn, A.J. and T.R. Gunn, *The 'pharmacology' of neuronal rescue with cerebral hypothermia*. Early Hum Dev, 1998. **53**(1): p. 19-35.
10. Azzopardi, D., et al., *The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial*. BMC Pediatr, 2008. **8**: p. 17.
11. Azzopardi, D.V., et al., *Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy*. N Engl J Med, 2009. **361**(14): p. 1349-58.
12. Roka, A. and D. Azzopardi, *Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy*. Early Hum Dev, 2010. **86**(6): p. 361-7.
13. Ashwal, S. and W.J. Pearce, *Animal models of neonatal stroke*. Curr Opin Pediatr, 2001. **13**(6): p. 506-16.
14. Vannucci, R.C., *Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage*. APMIS Suppl, 1993. **40**: p. 89-95.
15. Vannucci, R.C., et al., *Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage*. J Neurosci Res, 1999. **55**(2): p. 158-63.
16. Yager, J.Y., *Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn*. Semin Pediatr Neurol, 2004. **11**(1): p. 31-46.
17. Tumbleson, E. and L.B. Schook, *Advances in Swine in Biomedical Research*. 1996: Springer.
18. Johnston, M.V., *Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury*. Ann Neurol, 1983. **13**(5): p. 511-8.
19. Hsu, P., M. Shibata, and C.W. Leffler, *Prostanoid synthesis in response to high CO₂ in newborn pig brain microvascular endothelial cells*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1485-92.
20. Leffler, C.W., et al., *Topical arachidonic acid restores pial arteriolar dilation to hypercapnia of postischemic newborn pig brain*. Am J Physiol, 1992. **263**(3 Pt 2): p. H746-51.
21. Leffler, C.W., et al., *Light/dye microvascular injury selectively eliminates hypercapnia-induced pial arteriolar dilation in newborn pigs*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 2): p. H623-30.
22. Bari, F., et al., *Differential effects of short-term hypoxia and hypercapnia on N-methyl-D-aspartate-induced cerebral vasodilatation in piglets*. Stroke, 1996. **27**(9): p. 1634-9; discussion 1639-40.
23. Domoki, F., et al., *N-methyl-D-aspartate-induced vasodilation is mediated by endothelium-independent nitric oxide release in piglets*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(4): p. H1404-9.
24. Faraci, F.M. and K.R. Breese, *Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain*. Circ Res, 1993. **72**(2): p. 476-80.
25. Busija, D.W. and C.W. Leffler, *Dilator effects of amino acid neurotransmitters on piglet pial arterioles*. Am J Physiol, 1989. **257**(4 Pt 2): p. H1200-3.
26. Philip, S. and W.M. Armstead, *NMDA dilates pial arteries by KATP and Kca channel activation*. Brain Res Bull, 2004. **63**(2): p. 127-31.
27. Ohsawa, I., et al., *Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 688-94.
28. Ioroi, T., et al., *Changes in cerebral haemodynamics, regional oxygen saturation and amplitude-integrated continuous EEG during hypoxia-ischaemia and reperfusion in newborn piglets*. Exp Brain Res, 2002. **144**(2): p. 172-7.
29. Busija, D.W., et al., *Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-d-aspartate in cerebral cortex*. Brain Res Rev, 2007. **56**(1): p. 89-100.
30. Domoki, F., et al., *Reventilation with room air or 100% oxygen after asphyxia differentially affects cerebral neuropathology in newborn pigs*. Acta Paediatr, 2006. **95**(9): p. 1109-15.
31. Faraci, F.M., *Protecting against vascular disease in brain*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1566-82.
32. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure*. Circ Res, 1990. **66**(1): p. 8-17.
33. Bauer, R., et al., *Effect of hypoxia/hypercapnia on metabolism of 6-[(18)F]fluoro-L-DOPA in newborn piglets*. Brain Res, 2002. **934**(1): p. 23-33.

34. Busija, D.W. and C.W. Leffler, *Hypothermia reduces cerebral metabolic rate and cerebral blood flow in newborn pigs*. Am J Physiol, 1987. **253**(4 Pt 2): p. H869-73.
35. Domoki, F., et al., *Acetazolamide induces indomethacin and ischaemia-sensitive pial arteriolar vasodilation in the piglet*. Acta Paediatr, 2008. **97**(3): p. 280-4.
36. del Zoppo, G.J. and T. Mabuchi, *Cerebral microvessel responses to focal ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(8): p. 879-94.
37. Meng, W., J.R. Tobin, and D.W. Busija, *Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors*. Stroke, 1995. **26**(5): p. 857-62; discussion 863.
38. Busija, D.W., et al., *Effects of ischemia on cerebrovascular responses to N-methyl-D-aspartate in piglets*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. H1225-30.
39. Roth, S.C., et al., *Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years*. Dev Med Child Neurol, 1997. **39**(11): p. 718-25.
40. Domoki, F., et al., *Diazoxide preserves hypercapnia-induced arteriolar vasodilation after global cerebral ischemia in piglets*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H368-73.
41. Cai, J., et al., *Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model*. Neurosci Lett, 2008. **441**(2): p. 167-72.
42. Iadecola, C. and P.B. Gorelick, *The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets*. Stroke, 2005. **36**(2): p. 182-5.
43. Armstead, W.M., et al., *Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain*. Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 2): p. H401-3.
44. Perez-Polo, J.R., C.B. Reilly, and H.C. Rea, *Oxygen resuscitation after hypoxia ischemia stimulates prostaglandin pathway in rat cortex*. Int J Dev Neurosci, 2011. **29**(6): p. 639-44.
45. Degi, R., et al., *Effects of anoxic stress on prostaglandin H synthase isoforms in piglet brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1998. **107**(2): p. 265-76.
46. Domoki, F., et al., *Ischemia-reperfusion rapidly increases COX-2 expression in piglet cerebral arteries*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. H1207-14.
47. Degi, R., et al., *Regional distribution of prostaglandin H synthase-2 and neuronal nitric oxide synthase in piglet brain*. Pediatr Res, 1998. **43**(5): p. 683-9.
48. Eucker, S.A., et al., *Development of a fluorescent microsphere technique for rapid histological determination of cerebral blood flow*. Brain Res, 2010. **1326**: p. 128-34.
49. Rivkin, M.J., *Hypoxic-ischemic brain injury in the term newborn. Neuropathology, clinical aspects, and neuroimaging*. Clin Perinatol, 1997. **24**(3): p. 607-25.
50. Vannucci, R.C., *Mechanisms of perinatal hypoxic-ischemic brain damage*. Semin Perinatol, 1993. **17**(5): p. 330-7.
51. Lekic, T., et al., *Protective effect of hydrogen gas therapy after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats*. Acta Neurochir Suppl, 2011. **111**: p. 237-41.
52. Zhan, Y., et al., *Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats*. Crit Care Med, 2012. **40**(4): p. 1291-6.