Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

A terjedő depolarizáció vizsgálata iszkémiás és ozmotikus stressznek kitett patkány agyszeleten

Ph.D. értekezés tézisei

Frank Rita

Témavezetők: Dr. Menyhárt Ákos
Dr. Farkas Eszter

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged, 2021

Bevezetés

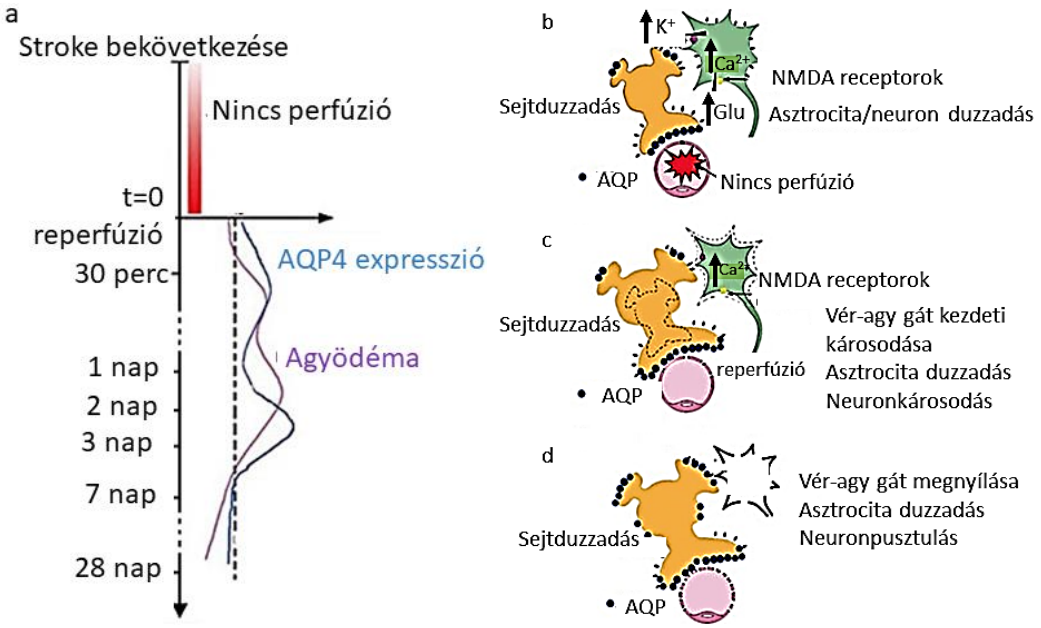
Napjainkban világszerte az akut agysérülések, köztük a stroke jelentik a második leggyakoribb halálokot. A World Health Organization jelentése szerint évente hozzávetőlegesen 15 millió ember szenved el stroke-ot. A stroke-os eseteknek két altípusát különíthetjük el: a haemorrhagiás, vagyis vérzéses és az érelzáródás okozta iszkémiás stroke-ot. Az iszkémiás stroke egy agyi artéria elzáródásának következtében kialakuló kórkép, melyben az érelzáródás helyéhez viszonyítva elkülöníthetünk egy mag és egy penumbra régiót. A mag régióban a sejtek elhalása az elzáródás után progresszíven zajlik, a magot körülvevő penumbra károsodása egy ideig reverzibilis, ez főként a területet ellátó kollaterális keringésnek köszönhető. Amennyiben a normál szöveti perfúzió nem áll helyre, akkor a penumbra sejtjei is irreverzibilisen károsodnak, így a mag régió mérete a penumbra rovására növekszik. A primer léziót gyakran súlyosbítják másodlagos kórfolyamatok (pl. agyödéma, vazospazmus, hipoperfúzió), melyek mérséklése a betegek jelentős hányada esetén a kritikus időablakon túl (>6 óra) is reális célkitűzés lehet.

Olyan kórképekben, mint az iszkémiás és vérzéses stroke, illetve a zárt koponyasérülés, a terjedő depolarizáció (spreading depolarization; SD) megjelenése hozzájárul a másodlagos sérülések kialakulásához és jelentősen rontja a betegség kimenetelét. Az SD a neuronok és gliasejtek egy kritikus tömegének együttes depolarizációja, mely egy pontszerű fókuszból kiindulva 2-6 mm/perces sebességgel terjed tova. Az SD tipikus elektrofiziológiai jellemzője a DC potenciál tranziens, negatív kitérése. A negatív DC potenciál-kitérés az idegsejtek potenciáljának a nyugalmi értékről a 0 mV-ot megközelítő eltolódását jelöli, ami mögött az extracelluláris káliumion-koncentráció ($[K^+]_e$) markáns emelkedése (30-60 mM), és ezzel együtt az extracelluláris nátrium- és a kalciumion-koncentráció csökkenése áll (Na^+: 50-70 mM; Ca^{2+}: 0,2-0,8 mM). A nátrium, kálcium és klorid beáramlása a sejtekbe passzív vízmozgást is okoz, ennek hatására pedig megduzzadnak a sejtek. Fokális agyi iszkémia kísérletes modelljében a depolarizációk ismételt megjelenése együtt járt az iszkémiás lézió növekedésével. Az utóbbi években klinikai megfigyelésekre alapozva kezdeményezték az SD-nek, mint biomarkernek a monitorozását az idegsebészeti intenzív osztályokon, mert az SD események jellemző mintázata jelzi az agysérülések előrehaladását.

Az SD megfigyelhető azonban optimálisan perfundált agyszövetben is. Ilyen kórkép az aurás migrén, melyben az SD a látókéregre terjedve hozza létre a szenzoros diszfunkciót. Kísérletes körülmények között normál glükóz- és oxigénellátás mellett az SD nem okoz maradandó

károsodást, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az iszkémiás stroke bekövetkezésének valószínűsége nagyobb az aurás migrénnel küzdő emberek körében.

Az agyödéma gyakran megjelenik olyan cerebrovaszkuláris kórképekben, mint az iszkémiás stroke vagy a zárt koponyasérülés. Az ödéma az intrakraniális nyomás fokozásával jelentősen rontja a betegség kimenetelét. Az akutan (stroke-ot követő percekben) jelentkező citotoxikus ödéma során a víz a sejtekbe áramlik, mely a neuronok és asztrociták duzzadását okozza (1. ábra). A fennálló glükóz- és oxigénhiány következtében az endotél sejtek transzmembrán ionegyensúlya felborul, amelynek eredményeként a sejteket összekapcsoló szoros kapcsolatok felbomlanak. A metabolikus krízis és a sejtek felborult ionegyensúlya a neuronok pusztulását, valamint a vér-agy gát megnyílását, albumin és más plazmafehérjék sérült agyszövetbe történő bejutását okozza. Az AQP4 csatorna a legyakrabban előforduló vízcsatorna az agyban, mely elsősorban az asztrociták végtalpain lokalizált. Ennek köszönhetően az asztrociták kiemelt szereppel bírnak az agyi vízháztartás szabályozásában. Agyi iszkémia kísérletes modelljében az asztrociták duzzadása pozitív összefüggést mutatott az SD-k hosszával. Továbbá, az asztrociták duzzadása a spontán megjelenő SD-k számával egyre nőtt, ezzel szemben egészséges szövetben az SD-k reverzibilis, rövid ideig fennálló asztrocita ödémát okoztak.



1. ábra Sematikus ábra az iszkémiás stroke következtében kialakuló agyödémáról. (a) Idővonal jelöli az iszkémiás stroke bekövetkezésétől eltelt időt, a kék görbe az AQP4 expresszióját, a lila görbe az agy duzzadását mutatja. (b) A kezdeti citotoxikus ödéma során elsősorban AQP4 csatornákon keresztül víz áramlik az asztrocitákba és a neuronokba. (c) A fennálló metabolikus krízis következményeként a neuronok pusztulása és a vér-agy gát megnyílása következik be. (d) Vazogén ödéma során a sérült területen a vér-agy gát teljes felbomlásának következtében albumin és más plazmafehérjék jutnak az agyszövetbe. Forrás: J. Badaut et al. 2011 alapján módosítva.

Az asztrociták központi szerepet töltenek be a normál neuronális működésben. A háromtagú szinapszis résztvevőjeként ezek a sejtek befolyással vannak a szinaptikus transzmisszióra és a neuronok ingerelhetőségére is. Az asztrociták felveszik az extracelluláris térben felszaporodó ionokat (pl. K^+), illetve neurotranszmittereket (pl. glutamát), ezeket metabolizálják, majd előanyagaikat visszajuttatják a neuronokhoz. A bumetanid-szenzitív $Na^+/K^+/Cl^-$ ko-transzporter-1 (NKCC1) is részt vesz a K^+ indukálta asztrocita duzzadásban. Az NKCC1-gyet az asztrociták expresszálják. Az NKCC1 az agy minden területén megtalálható és működése iszkémiát követően fokozódik. *In vitro* primer asztrocita kultúrákban kimutatták, hogy az NKCC1 magas K^+ koncentráció mellett hozzájárul a sejtek duzzadásához. Az extracelluláris glutamát-koncentráció asztrociták általi szabályozása elengedhetetlen a neuronális ingerelhetőség szabályozásában. Szinaptikus ingerületátvitel során a felszabaduló glutamát csupán 20 %-a kötődik a posztszinaptikus neuronok receptoraihoz. Az extraszinaptikus glutamát eltávolítása az asztrociták serkentő aminosav transzporterei (EAAT1, EAAT2) által valósul meg. A glutamát visszavétele az egyik legenergiaigényesebb folyamat az agyban, azonban az iszkémia okozta ATP hiány és a magas extracelluláris K^+ koncentráció eredményeként az asztrociták transzporterei reverz módon kezdenek működni, ami glutamát felhalmozódásához vezethet az extracelluláris térben A duzzadásuk miatt az asztrociták térfogatszenzitív anion csatornáikon (volume regulated anion channel; VRAC) keresztül glutamátot ürítenek az interstíciumba, mely hozzájárul a glutamát-koncentráció emelkedéséhez.

A túlélő agyszeletek használata elterjedt *in vitro* kísérleti módszer az idegtudományban. Az *in vitro* preparátumok alkalmazásának egyik legnagyobb előnye, hogy a metszetek környezete jól kontrollálható, így a kísérletek megbízhatóan, könnyen reprodukálhatóak. Az agyszelet preparátumok használatának további előnye, hogy egy állat feláldozásával több agyszelet nyerhető, ami jelentősen csökkenti a felhasznált állatok mennyiségét (3R elve). Az agyszeletek egyértelmű hátránya az idegsejtek kapcsolatainak átmetszése a szeletkészítés során, így nincs lehetőségünk a neuronhálózatok működésének vizsgálatára. További hátrány, hogy ebben a modellrendszerben a vaszkuláris válaszok és komplex, szervrendszereket érintő változások vizsgálata nem kivitelezhető. Az agyszelet preparátumokon vizsgálhatjuk különféle hatóanyagok sejtélettanra gyakorolt hatását, oxigén és glükóz megvonásával modellezhetünk iszkémiát, a szeletet hipo-ozmotikus közegbe helyezve pedig agyödéma aspektusai tanulmányozhatók. A fent leírtak alapján hipotéziseink az alábbiak voltak: ***(I) az SD jelentősen csökkenti a szövet életképességét a homeosztatikus egyensúly megbomlása után; (II) illetve***

az akut agyödéma következtében kialakuló asztrocita duzzadás extracelluláris glutamát és K^+ felhalmozódáshoz vezet, ezzel fokozva az iszkémiás lézió kiterjedését. Hipotéziseink bizonyításához célul tűztük ki: ***(I) az SD-k kialakulásának összehasonlító vizsgálatát fiziológiás körülmények között és metabolikus, ozmotikus stressznek kitett agyszeletekben. (II) Az ödéma modellezését élő agyszelet preparátumokon hipo-ozmotikus oldat segítségével; továbbá az asztrociták szerepének meghatározását akut agyödéma során.***

Anyagok és módszerek

Kísérleteinkben hím, fiatal felnőtt Sprague-Dawley és Wistar patkányokat (n=98) mélyaltatásban dekapitáltunk, agyukból vibratóm segítségével 350 µm-es coronalis metszeteket készítettünk. A kísérletek során az agyszeleteket egy "interface" típusú szövetkamrában 32°C-on tartottuk, melyben a karbogénnel buborékoltatott aCSF folyamatos áramlását (2,5 ml/perc) biztosítottuk. Az LFP méréséhez egy üvegkapilláris-elektródát helyeztünk a cortex III-IV. rétegébe. Referenciaként egy, az agyszelet kamra kifolyó nyílásába helyezett Ag/AgCl elektróda szolgált. A szöveti fehér fény reflektancia méréséhez a szeleteket halogén lámpával világítottuk meg. A képsorokat 1 Hz-es frekvencián CCD kamera segítségével rögzítettük, melyet sztereo-mikroszkóphoz csatlakoztattunk.

A terjedő depolarizációk összehasonlító vizsgálata ozmotikus és metabolikus stressznek kitett agyszeleteken

SD-k kiváltása

Kísérleteink egy részében a szeletek egyenáramú ingerlésével váltottunk ki (ES) SD-ket, az alkalmazott töltés mennyisége 50 és 1500 µC között változott. Más szeletekben az SD-k kiváltásához 1 M-os KCl oldatot alkalmaztunk (kb. 150 picoliter), melyet picospritzer segítségével juttatunk a szeletekre. A KCl és ES csoportokban 4-5 SD-t váltottunk ki 10-12 perces időközönként.

Hipo-ozmotikus kezelés során az inkubáló aCSF NaCl koncentrációját csökkentve (130 mM-ról 100 és 60 mM-ra; HM_{100}, HM_{60}) a szeleteket hipo-ozmotikus stressznek tettük ki. Tíz perces alapvonal felvételét követően a hipo-ozmotikus oldatot a szeletekre mostuk, melynek eredményeként spontán megjelenő SD-ket regisztráltunk.

Oxigén-glükóz depriváció (OGD) során a szeletekre glükózmentes aCSF oldatot mostunk és a gázkeverékből megvontuk az oxigént. Az OGD eredményeként minden szeletben spontán létrejövő SD-ket regisztráltunk.

Szövettan

Az agyszeletek életképességét TTC festéssel vizsgáltuk. A metszetekről fénymikroszkópos fotókat készítettünk 10 x-es nagyításon. A sejtpusztulás még részletesebb vizsgálatához a TTC-vel festett szeletekből 10-µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket hematoxilin-eozinnal festettünk meg. A metszetekről fénymikroszkópos fotókat készítettünk 40 x-es nagyításon.

A szimultán depolarizáció vizsgálata patkány agyszeletekben

A kísérletek során a szeleteket hipo-ozmotikus stressznek tettük ki, melyet a fentebb leírt módszerrel hoztunk létre. A protokoll során a szeletekre 30 percen keresztül HM oldatot mostunk, majd ezt követően 2,5 perces anoxiát hoztunk létre. A kontroll szeletek esetén SD-t elektromos ingerléssel váltottunk ki (SD1), majd a következő depolarizációt (rSD) 2,5 perces oxigénmegvonással idéztük elő. A hiperozmotikus (HRM) kezelés esetén a normál aCSF oldathoz 100 mM mannitolt adtunk. A kezelés során a szeleteket 30 percen keresztül HM oldatba helyeztük, majd az inkubáló oldatot HRM oldatra cseréltük. A HM kezelés hatására spontán SD alakult ki, a HRM kezelés alatt depolarizációt 2,5 perces anoxiával váltottunk ki.

Farmakológiai kezelések

Az ödéma farmakológiai csökkentése során a szeleteket az NKCC1 gátló bumetanid (1 mM) és az AQP4 blokkoló TGN-020 (100 µM) koktéljával kezeltük. A térfogat szenzitív anion csatornákat DCPIB-vel (20 µM), az NMDA, AMPA és kainát receptorokat MK-801+CNQX-szel (100 µM; 20 µM) blokkoltuk. Az EAAT2-t TFB-TBOA-val (10 µM; 100 µM) antagonizáltuk, az asztrociták metabolizmusának gátlására pedig fluorocitrátot (0,5; 1 mM) alkalmaztunk.

Extracelluláris glutamát koncentráció mérése

Az extracelluláris glutamát koncentrációt glutamát-oxidáz enzim alapú bioszenzor segítségével mértük. A bioszenzort az LFP elektródákkal együtt az agykéreg III-IV. rétegébe szúrtuk.

Szövettan

Az asztrociták duzzadásának vizsgálatára módosított Golgi-Cox festést végeztünk, majd a kéreg III-IV. rétegéről reprezentatív fénymikroszkópos fotókat készítettünk. Elektronmikroszkópos felvételek készítéséhez a szeletekből ultravékony metszeteket készítettünk. Kontrasztozást (5% uranil-acetát és Reynolds-féle ólom-citrát oldat) követően transzmissziós elektronmikroszkóppal (Jeol JEM 1400 Plus) vizsgáltuk, felvételeket CCD kamera segítségével készítettünk.

Eredmények

A terjedő depolarizációk összehasonlító vizsgálata ozmotikus és metabolikus stressznek kitett agyszeleteken

Először az ozmotikus és metabolikus stressz hatására kialakuló SD-k elektrofiziológiai paramétereit hasonlítottuk össze fiziológiás körülmények között, fokális stimulussal (KCl, ES) kiváltott SD-kkel. A HM és OGD csoportban kialakuló spontán SD-k félamplitúdóhoz tartozó ideje hosszabb volt, mint a KCl és ES csoportokban kialakuló depolarizációké (195,65±117,05 vs. 112,14±88,39 vs. 54,75±26,72 vs. 33,95±26,615 s, HM vs. OGD vs. ES vs. KCl). A HM és OGD csoportokban csak részleges volt a repolarizáció, melyet tükröz, hogy a repolarizáció meredeksége itt kisebb volt, mint a KCl és ES csoportban kialakuló SD-k esetén (0,30±0,17 vs. 0,12±0,10 vs. 0,50±0,24 vs. 0,45±0,27 mV/s HM vs. OGD vs. ES vs. KCl). Az SD-k fókusza a HM és OGD csoportokban nagyobb kiterjedésű volt az aCSF-ben KCl és ES stimulusokkal kiváltott SD-khez képest (2,64±1,27 vs. 2,23±0,82 vs. 1,93±0,74 vs. 1,37±0,5 % a teljes kérgi területnek, HM vs. OGD vs. ES vs. KCl). Továbbá megfigyeltük, hogy a globális stimulusra (HM, OGD) kialakuló SD-k nagyobb kérgi területet érintenek, mint az ES és KCl csoportokban létrejövő depolarizációk (71,98±13,43 vs. 85,32±5,32 vs. 40,4±20,66 vs. 36,72±9,39 % a teljes kérgi területnek, HM vs. OGD vs. ES vs. KCl). TTC festéssel vizsgáltuk a szövet életképességét a depolarizációkat követően. A szövetben a megfestődött szemcsék (partikulumok) mennyiségének csökkenését tekintettük az alacsonyabb életképesség indikátorának. HM és OGD csoportokban a depolarizációt követően jelentős mértékben csökkent a megfestődött partikulumok száma a KCl csoporthoz képest (26,45±10,64 and 11,44±6,42 vs. 54,33±21,21 partikulum/ 1000 μm^2, HM and OGD vs. KCl). Azonban fontos megjegyezni, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott SD-k jelentős sejtpusztulást okoztak a KCl csoporthoz hasonlítva (30,28±9,84 vs. 54,33±21,21 partikulum/ 1000 μm^2, ES vs. KCl). A szövet integritását hematoxilin-eozin festéssel is vizsgáltuk, mely során szintén az OGD és HM kezelés hatására kialakuló SD-k bizonyultak a legkárosabbnak, ezekben a szeletekben a neuronok sejtmagjának kondenzálódása volt megfigyelhető, míg KCl csoportban a neuronok sejtmagja jól körülhatárolt volt. Végül az SD-által érintett terület és a partikulumok számának vizsgálata során negatív korrelációt találtunk, vagyis a nagyobb kérgi területet érintő depolarizációk alacsonyabb partikulum számot eredményeztek.

A szimultán depolarizáció vizsgálata patkány agyszeletekben

Korábbi *in vivo* állatkísérleteinkben megfigyeltük, hogy ödémás szövetben oxigénmegvonás hatására az agykéreg egy kiterjedt része egyszerre depolarizálódik, ezt a jelenséget szimultán depolarizációnak (SiD) neveztük el. Feltételeztük, hogy az SiD hátterében az asztrociták kóros duzzadása áll, ezért ödémát az agyszeletekben hipo-ozmotikus kezeléssel idéztünk elő. A hipo-ozmotikus oldat hatására a HM csoportban az első depolarizáció (SD1) spontán alakult ki, míg a normál aCSF-ben inkubált szeletekben elektromos ingerléssel váltottunk ki depolarizációt. A 2,5 perces anoxia az aCSF csoportban újabb SD-t (rSD), míg a HM csoportban a szeletek többségében (35 szeletben a 44-ből; 80%) SiD-t eredményezett. Az első SD fókusza mindkét csoportban kis kiterjedésű, pontszerű volt (<1 % a teljes kérgi területnek). SD1 terjedési sebessége gyorsabb volt a HM csoportban, mint a kontroll szeletek esetében (3,17±0,58 vs. 1,97±0,18 mm/perc, HM vs. aCSF). Megfigyeltük, hogy az anoxiára kialakult SiD azon a kérgi területen alakult ki, amit már az SD1 érintett és SiD során a kéreg jelentős része egyidőben, szimultán módon depolarizálódott (>50% a teljes kérgi területnek). Ezek alapján az ozmotikus stressznek kitett agyszeletekben a spontán kialakuló SD1 területe a későbbi, anoxiás inzultusra kialakuló SiD fókuszának feleltethető meg.

Annak bizonyítására, hogy az asztrociták duzzadása hozzájárul az SiD kialakulásához, meghatároztuk az ozmotikus stressz okozta szöveti duzzadást. Az aCSF-ben inkubált szeletek esetén az SD1-gyel kismértékű felszín-növekedést figyeltünk meg (1,09±0,68 %), SD1 után a szelet felszínének területe visszatért az alapvonali állapothoz (0,19±0,15 %.). Az anoxiára kialakuló második SD során nagyobb mértékű duzzadást tapasztaltunk SD1-hez képest (4,75±1.33 vs. 1,09±0,68 %., rSD vs. SD1), de a duzzadás ismét reverzibilis és tranziens volt. A HM csoportban a szelet térfogatnövekedése a HM oldat rámosásakor kezdődött, és a szelet jelentős duzzadást mutatott a spontán kialakuló SD1 előtt (4,59±1,14 vs. 4,15±1,11 vs. 0,07±0,09 %., HM_{60} vs. HM_{100} vs. aCSF). Az SD1-gyet követően a szeletek duzzadása megtartott volt, nem tért vissza a depolarizáció előtti szintre. Fontos megjegyezni, hogy a HM csoportban a szöveti duzzadás megelőzte a spontán SD kialakulását, míg ezzel szemben az aCSF csoportban csak depolarizációs eseményekhez kapcsolt duzzadást figyeltünk meg.

Szakirodalomból ismert megfigyelés, hogy az asztrociták ozmotikus stressz hatására megduzzadnak, ezért feltételeztük, hogy az asztrocita ödéma nagymértékben hozzájárul a HM kezelés hatására kialakuló SiD-hez. Az asztrociták duzzadása mind a Golgi-Cox-szal festett mind az elektronmikroszkópos metszeteken jól látható volt. Az elektronmikroszkópos

felvételeken megfigyeltük, hogy az asztrociták citoplazmája és nyúlványai is jelentősen megduzzadtak a HM kezelés hatására.

Feltételeztük, hogy az asztrociták duzzadása a neuronális ingerelhetőség fokozásával is hozzájárul az SiD kialakulásához, ezért meghatároztuk a kiváltott potenciálok amplitúdóját. A kiváltott potenciálok amplitúdója a HM csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint az aCSF csoportban (171,0±11,8 vs. 184,3±7,4 vs. 93,1±9,3 μV, HM_{60} vs. HM_{100} vs. aCSF). Az SiD vagy rSD kialakulásának latenciája (az anoxia kezdetétől a depolarizáció kezdetéig eltelt idő) rövidebb volt a HM csoportban (46,9±24,3 vs. 45,9±18,2 vs. 86,9±28,7 s; SiD HM_{60} vs. HM_{100} vs. rSD aCSF-ben). Továbbá, a depolarizációk kiválthatósági küszöbértéke jelentősen csökkent a HM kezelés hatására (50,1±15,7 vs. 52,5±18,4 vs. 1214,3±470,6 μC, HM_{60} vs. HM_{100} vs. aCSF). Azt, hogy asztrociták duzzadása csökkenti az SD elektromos kiválthatósági küszöbét igazolta az a megfigyelésünk is, hogy a fluorocitráttal kezelt szeletekben a HM csoporthoz hasonlóan csökkent az SD kiváltási küszöb (51,0±22,9 vs. 52,5±18,4 μC, fluorocitrát vs. HM_{100}).

Az SD-ről ismert, hogy hozzájárul az iszkémiás penumbra régió mag régióvá alakulásához. Továbbá tudjuk, hogy a citotoxikus ödéma szintén összefüggésben áll az SD okozta sejtkárosodással. Kísérleteink során feltételeztük, hogy az asztrocita- ödéma és az SiD fokozza a szöveti károsodás mértékét. Az SiD során minden szelet esetében nagyobb terület depolarizálódott, mint SD1 alatt (76,8±11,4 vs. 60,9±10,7 %, SiD vs. SD1). Illetve a TTC-vel festett metszeteken is jól látszódott, hogy az SiD sokkal nagyobb mértékű sejtkárosodást okozott a HM kezelés alatt spontán kialakuló SD1-hez képest. A TTC-vel festődött partikulumok száma jelentősen lecsökkent azokban a szeleteken, ahol SiD is kialakult (5,0±1,1 vs. 35,8±3,0 vs. 43,5±1,0 partikulum/ 1000 μm^2, SiD HM-ben vs. SD1 HM-ben vs. aCSF).

A továbbiakban feltételeztük, hogy az ödéma indukálta glutamát felszabadulás, illetve az asztrociták glutamát visszavételének csökkenése tehető leginkább felelőssé az SiD kialakulásáért. Az elképzelést alátámasztja az a korábbi kísérletes megfigyelés, miszerint az asztrociták ozmotikus stressz hatására megduzzadnak, melynek következtében glutamátot ürítenek az extracelluláris térbe.

Az ozmotikus stressznek kitett szeletekben az extracelluláris glutamát koncentrációja folyamatosan emelkedett a sejtduzzadással együtt, az SD1 során már 10 μM-os glutamát koncentrációt mértünk. A glutamát extracelluláris szintje az SD1 után tovább emelkedett (15 μM) és nem tért vissza a korábbi szintre, majd az SiD egy újabb glutamát csúcsot eredményezett (>20 μM).

Az asztrocita AQP4 és NKCC1 blokkolása TGN+Bumetaniddal, illetve a térfogat szenzitív csatornák DCPIB-vel történő gátlása jelentősen csökkentette a szöveti duzzadást. Továbbá, TGN+Bumetanid és a DCPIB kezelések hatására csökkent az SD1-gyel járó glutamát felszabadulás. Mindkét kezelés szignifikánsan csökkentette a SiD előfordulásának gyakoriságát (2/16 (13%) vs. 3/23 (13%) vs. 28/33 (85%) szelet; TGN+Bum vs. DCPIB vs. HM_{60}). Fontos megjegyezni, hogy a kezelt szeletek többségében anoxiára egy második rSD alakult ki, szemben a HM csoportban anoxiára kialakuló SiD-vel. A kezelés hatására az rSD-k fókusza is kisebb volt (<1 % a teljes kérgi területnek), míg az SiD fókusza a HM csoportban a kéreg 55,5±7,2 %-át érintette.

Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy az asztrociták metabolizmusának gátlása igazolja-e az asztrocita diszfunkció szerepét az SiD kiváltásában. A szeleteket az asztrociták citrátkörét gátló fluorocitráttal kezeltük. A fluorocitrát kezelés hatására ugyanazt figyeltük meg, mint az ozmotikus stressznek kitett szeletek esetén, vagyis (i) az SD kiválthatósági küszöbértéke csökkent; (ii) az SD1 spontán alakult ki (5-ből 4 szelet esetében), és (iii) az anoxia SiD-t eredményezett (5-ből 3 szelet esetén). Az asztrocita EAAT2 gátlása nagymértékű extracelluláris glutamát felhalmozódást idézett elő (29,5±9,9 μM), és a kezelés alatt anoxiára válaszul SiD jött létre. A TBOA-val kezelt szeletek esetén az extracelluláris glutamát felhalmozódás az SiD alatt még intenzívebb volt (65,3±18,1 μM).

Az extracelluláris glutamát forrásának meghatározása érdekében gátoltuk az AMPA, NMDA és kainát receptorokat. Az ionotróp glutamát receptorok antagonizmusa az SiD kialakulását gátolta, viszont a szöveti duzzadást csak kismértékben tudta csökkenteni. Továbbá, ez a kezelés csökkentette legkevésbé az extracelluláris glutamát felhalmozódást. Ezen eredményeink is bizonyítják, hogy ödémás szövetben az extracelluláris glutamát felhalmozódásához nem csak a neuronokból felszabaduló glutamát, hanem az asztrociták korlátozott glutamát-felvétele vagy glutamát-ürítése is jelentősen hozzájárul.

További kísérleteinkben feltételeztük, hogy a szöveti ödéma visszafordítása hiperozmotikus kezeléssel (HRM) csökkentheti az extracelluláris glutamát-koncentrációt, és gátolhatja az SiD kialakulását. A HRM kezelés visszafordította az ozmotikus stressz által kialakuló sejtduzzadást és helyreállította a fiziológiás glutamát szintet. Továbbá, a HRM kezelés alatt anoxiával nem tudtunk depolarizációt kiváltani. Az SD kiválthatósági küszöbértéke jelentősen emelkedett a kezelés hatására (2422,5±341,7 vs. 54,0±2,1 vs. 1220,0±6,2 μC, HRM vs. HM_{100} vs. aCSF). A szöveti duzzadás és az extracelluláris glutamát felhalmozódás pozitív korrelációt mutatott. (r=0,819**). Ezek alapján elmondható, hogy az extracelluláris glutamát felhalmozódás szoros

összefüggésben áll a szöveti ödémával, illetve az ödéma csökkentése hatékonyan mérsékelte a glutamát-felhalmozódást, és gátolta az SiD-t.

Diszkusszió

A terjedő depolarizációk összehasonlító vizsgálata ozmotikus és metabolikus stressznek kitett agyszeleteken

Kísérletes munkánk során összehasonlítottuk az ozmotikus vagy metabolikus stressz hatására spontán kialakuló és a fiziológiás körülmények között, fokális ingerléssel kiváltott terjedő depolarizációkat. Kísérleteinkben vizsgáltuk az SD-k elektrofiziológiai paraméterei mellett a depolarizációk tér- és időbeli tulajdonságait szöveti fehér fény reflektancia- alapú képalkotással. Továbbá, szövettani módszerek segítségével az SD-k sejtkárosító hatását követtük nyomon.

Globális iszkémiás (szívmegállást modellező) állapotot oxigén-glükóz megvonással (OGD) idéztünk elő. Az OGD egy széleskörben alkalmazott modell iszkémia létrehozására, melynek segítségével az iszkémiás mag régióban lejátszódó folyamatokat lehet vizsgálni. Az ozmotikus stresszt a szeletekben hipo-ozmotikus kezeléssel hoztuk létre, mellyel agyödémát modelleztünk. A kontroll szeletek egy részében 1 M-os KCl oldat befecskendezésével váltottunk ki depolarizációkat. Ezek a fokális kiváltással létrejövő SD-k leginkább az aurás migrén során kialakuló SD-knek feleltethetők meg. A kontroll szeletek másik hányadában elektromos ingerléssel hoztunk létre SD-ket. Ezt a modellt gyakran alkalmazzák azzal, a céllal, hogy meghatározzák a depolarizációk elektromos kiválthatósági küszöbét.

Mind a HM mind az OGD kezelés hatására spontán SD-k alakultak ki, melyeket lassú repolarizáció követett, és az agykéreg jelentős részén végig terjedtek. A 15-20 percig fennálló OGD kezelés során a spontán kialakuló SD nagymértékű sejtpusztulást okozott minden kérgi rétegben, amely magyarázza, hogy ebben a modellben második depolarizációs esemény nem volt kiváltható. Az ödéma modellünkben kialakuló SD-k is kiterjedt sejtkárosodást idéztek elő, de ez kisebb mértékű volt, mint az OGD-nek kitett szeletek esetén. A kontroll szeletekben mind elektromos mind KCl-os ingerléssel 4-5 egymást követő depolarizáció volt kiváltható, amely jelzi, hogy a fokális ingerlés sokkal kevésbé csökkentette a szeletek életképességét. Az alkalmazott fokális stimulusok közül legkevésbé károsnak a KCl-os ingerlés bizonyult, ezekben a szeletekben az általunk alkalmazott szövettani módszerek nem mutattak ki sejtkárosodást. Ezzel szemben az elektromos ingerléssel kiváltott SD-k után a neuronok pusztulása igen

jelentős volt. Ennek oka lehet, hogy az SD kiváltásához szükséges töltésmennyiség leadásakor az ingerlő elektróda helyén, az ingerlés eredményeként nekrotikus lézió alakul ki.

Eredményeink összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy kísérleteinkben modelleztük (i) az intakt agyszövetben kialakuló minimális káros hatással járó SD-ket, (ii) a hipo-ozmotikus körülmények között kialakuló elnyújtott, szövetkárosító potenciállal bíró depolarizációkat, (iii) és az iszkémiás szövetben kialakuló terminális SD-ket. Az általunk létrehozott modellekben kialakuló depolarizációk tulajdonságai jól jellemzik a szövet metabolikus állapotát. Például a lassú repolarizációs fázis indikátora a nem megfelelő K^+ és glutamát visszavételnek, melyet OGD alatt az ATP hiány következtében kialakuló Na^+/K^+ ATPáz diszfunkció okozhat. A lassabb repolarizációs fázis és az elnyújtott depolarizációk hátterében a HM kezelés alatt a gliasejtek/asztrociták sérült K^+ és glutamát felvétele állhat. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a Na^+/K^+ ATPáz diszfunkciója és az asztrociták sérült pufferkapacitása eredményezi, hogy a metabolikus és ozmotikus krízisnek kitett szeletekben az SD-k hosszabb ideig tartanak, nagyobb kiterjedésűek, és fokozzák az iszkémiás lézió kiterjedését.

A szimultán depolarizáció vizsgálata patkány agyszeletekben

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a kísérletesen létrehozott akut agyödéma spontán kialakuló SD-t eredményezett, melyet követően az ödémás szövetben létrehozott anoxia az agykéreg nagy kiterjedésű, szimultán depolarizációját idézte elő. Az SiD által érintett kérgi terület nagymértékben átfed a korábbi, spontán kialakuló SD fókuszával. Az SiD kialakulását elősegítette az asztrociták duzzadása. A hipo-ozmotikus körülmények között létrejövő glia duzzadást jelzi a glutamát extracelluláris térben való felhalmozódása, mely az SiD alatt még intenzívebbé vált. Továbbá, az SiD a neuronok és az asztrociták pusztulását is okozza, ezzel is alátámasztva azt, hogy az SiD nagymértékben hozzájárul az iszkémiás lézió növekedéséhez. A hiperozmotikus kezelés hatékonyan csökkentette a szövet ingerelhetőségét, illetve megelőzött minden olyan folyamatot, amelyet az SiD kialakulásával összefüggésbe hoztunk.

Kísérleteinkben elsőként vizsgáltuk az SiD mechanizmusát. Ugyan a szakirodalomban már tesznek említést a kéregben kialakuló szimultán depolarizációról, de ezt eddig kísérleti eredményekkel nem támasztották alá. Illetve, SiD-szerű depolarizációkat figyeltek már meg agyszelet preparátumokon hipo-ozmotikus, anoxiás inzultus eredményeként, de a jelenség pontosabb mechanizmusait nem írták le. Hangsúlyozza az SiD kórélettani szerepét, hogy stroke-on átesett beteg agyában a páciens halála előtt is megfigyelhető volt ezt a jelenség. Ez a

megfigyelés is alátámasztja azt, hogy az SiD-nek a klinikumban is van relevanciája, illetve patofiziológiai jellemzőinek pontosabb megismerése kiemelt fontosságú.

In vitro agyszelet modellünkben hipo-ozmotikus oldattal hoztunk létre ödémát, úgy hogy az inkubáló aCSF oldat Na^+ tartalmát 100, illetve 60 mM-ra csökkentettük le. Ez a modell az SiD tanulmányozását szolgálta, valódi kórképet minden komplexitásában nem reprodukál. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a Na^+ extracelluláris koncentrációja SD során, lokalizáltan 50-70 mM-ra csökkenhet.

A modellünkben ödéma hatására kialakuló SiD elsősorban az asztrociták diszfunckiójával hozható összefüggésbe, melyet bizonyít az is, hogy a gliák metabolizmusának fluorocitráttal történő gátlása ugyanúgy SiD-t hozott létre, mint a HM kezelés. Az asztrocita végtalpakon található AQP4 csatornák részt vesznek az ozmotikus vízmozgásban, ennek köszönhetően az asztrociták membránja sokkal átjárhatóbb a vízre nézve, mint a neuronoké. Ugyanakkor, az SD-vel járó citotoxikus duzzadás az asztrociták mellett a neuronokat is érinti, hiszen mindkét sejten találhatók $Na^+/K^+/ Cl^-$ ko-transzporterek, amelyeken keresztül a beáramló Cl^- ionokat passzívan a víz is követi. A HM kezelésnek kitett szeletekben az asztrociták duzzadását tapasztaltuk, az AQP4 és az NKCC1 gátlása megelőzte az ödéma kialakulását és gátolta az SiD-t. Ezek az eredmények is rávilágítanak az asztrociták központi szerepére az SiD kialakulásában. Az asztrociták duzzadásuk során, annak érdekében, hogy csökkenjen térfogatuk VRAC csatornáikon keresztül ozmolitot, glutamátot ürítenek. Mindemellett, a duzzadt asztrociták EAAT2-n keresztüli glutamát felvétele gátolt. A két folyamat együttesen az extracelluláris glutamátszint növekedését eredményezi. Kísérleteinkben a VRAC gátlása megelőzte az extracelluláris glutamát-koncentráció növekedést, csökkentette a depolarizációk fókuszának méretét és gátolta az SiD kialakulását. Ugyanakkor az EAAT2 gátlása SiD-t eredményezett. Az AMPA és NMDA receptorok antagonizálása csak részben volt hatékony az SiD ellen. Ebből arra következtethetünk, hogy az extracelluláris glutamát felhalmozódásáért elsősorban az asztrociták tehetők felelőssé. Bár a terjedő depolarizáció egy, elsősorban a neuronokat érintő jelenség, eredményeink hangsúlyozzák az asztrociták elengedhetetlen szerepét ebben a folyamatban.

Az agyödéma klinikai kezelése akut sérülés esetén jelenleg az intrakraniális nyomás csökkentésével és az agyi keringés fenntartásával (ozmoterápia, hipotermia) valósítható meg. Eredményeinkre támaszkodva elmondhatjuk, hogy a hiperozmotikus kezelés csökkentette az idegszövet ingerelhetőségét és gátolta az agykéreg egyidejű, kiterjedt depolarizációját, ezáltal felvetve új terápiás lehetőségek létrehozását az akut agysérülés klinikai kezelésében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőimnek Dr. Menyhárt Ákosnak és Dr. Farkas Eszternek. Köszönöm Ákosnak, hogy kísérletes munkám során mindig számíthattam segítségére, köszönöm neki, hogy mindig igyekezett mind elméleti, mind gyakorlati tudását átadni. Hálával tartozom Eszternek, aki lehetővé tette, hogy csatlakozzak a kutatócsoportjához, témavezetésével és tanácsaival nagyon sokat segített abban, hogy befejezhessem a kísérletes projektjeimet és a tézisem.

Köszönettel tartozom jelenlegi és volt kollegáimnak és egyúttal barátaimnak a sok segítségért és támogatásért: Dr. Szabó Írisznek, Dr. Varga Dániel Péternek, Dr. M. Tóth Orsolyának, Dr. Varga Viktória Évának, Törteli Annának, Dr. Tóth Rékának, Dr. V. Kecskés Szilviának, Dr. Bálint Armand Rafaelnek, Ivánkovitsné Kiss Orsolyának és Makra Péternek.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette és támogatta a munkámat az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben. Szintén szeretném megköszönni Dr. Peták Ferenc Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette a munkámat az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben.

Hálásan köszönöm Dr. Toldi József Professzor Úrnak és Dr. Kocsis Kittinek, hogy bevezettek a tudomány és a labormunka világába.

És végül, de nem utolsósorban teljes szívemből köszönöm családomnak a végnélküli szeretetüket és támogatásukat. Hálával tartozom férjemnek, Tominak, hogy támogatott, bátorított és mindig mellettem állt.

A tézis alapjául szolgáló publikációk:

1. **Rita Frank**, Ferenc Bari, Ákos Menyhárt, Eszter Farkas *Comparative analysis of spreading depolarizations in brain slices exposed to osmotic or metabolic stress.* BMC Neuroscience 2021 May 3;22(1):33. doi: 10.1186/s12868-021-00637-0. **IF: 3.288**

2. Ákos Menyhárt [a], **Rita Frank [a]**, Attila E. Farkas, Zoltán Süle, Viktória É. Varga, Ádám Nyúl-Tóth, Anne Meiller, Orsolya Ivánkovits-Kiss, Coline L. Lemale, Írisz Szabó, Réka Tóth, Dániel Zölei-Szénási, Johannes Woitzik, Stephane Marinesco, István A. Krizbai, Ferenc Bari, Jens P. Dreier, Eszter Farkas *Malignant astrocyte swelling and impaired glutamate clearance drive the expansion of injurious spreading depolarization foci* Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism August 24, 2021., DOI: 10.1177/0271678X211040056 **IF: 6.200**