

Az agyi vérátáramlás szabályozása hipoxiás állapot és  
kísérletes roham után újszülött malacban

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Zimmermann Alíz

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Élettani Intézet

Szeged

2008

## Bevezetés

Az újszülöttek 5-10%-át érintő perinatális aszfixia súlyos, gyakran egész életen át ható központi idegrendszeri károsodásokat okoz, mint a mentális retardáció vagy az epilepszia. A hipoxiás állapotok, mint az aszfixia és az agyi iszkémia, valamint a következményes görcsrohamok alatt megszűnik az agyi metabolikus aktivitás és a vérátáramlás egyensúlya, ami az agyi erek funkciózavarához és idegsejt károsodáshoz vezet. A hipoxia mérséklésének legelfogadottabb és leggyorsabb módja a 100% O<sub>2</sub>-nel történő lélegeztetés, amelyet az újszülöttek újraélesztéséhez az 1930-as évek óta használnak. Számos tanulmány azonban azt mutatta, hogy az oxigén túlkínálat súlyosbíthatja a hipoxia által okozott károsodást. Klinikai vizsgálatok szerint az újszülöttek újraélesztése ugyanolyan eredményesen végezhető szobalevegő használatával, mint 100% O<sub>2</sub>-nel. Nem tisztázott azonban, hogy a lélegeztetéshez használt gázkeverék O<sub>2</sub> tartalma hogyan befolyásolja a szövettanilag kimutatható központi idegrendszeri károsodást. Ezért kísérleteink első részében megvizsgáltuk, hogy aszfixiát követően a szobalevegővel illetve oxigénnel végzett reventiláció hogyan befolyásolja az idegsejtkárosodást és az agyi vérkeringés változásait.

Az idegsejtkárosodás kialakulásához jelentős mértékben hozzájárulhat az agyi erek funkciózavara, mivel a csökkent érreaktivitás az agyszövet hipoperfúziójához vezethet. Az agyi vérátáramlás szabályozásának egyik legfontosabb tényezője az artériás CO<sub>2</sub> tenzió. Az újszülött agyi erekben a CO<sub>2</sub> ciklooxigenáz (COX) metabolitok közvetítésével, endotélium-függő úton fejt ki erőteljes értágító hatását. Az agyi erek CO<sub>2</sub> iránti válaszkészségét károsítja mind a hipoxia/iszkémia, mind az epilepszia, ezért ennek a válaszkészségnek a mérése az agyi érfunkció indikátoraként használható. Az agyi érreaktivitást a klinikai gyakorlatban a cerebrovaszkuláris rezerv kapacitással jellemzik. Ennek meghatározása során a CO<sub>2</sub> lélegeztetéssel vagy intravénás acetazolamiddal (AZD) kiváltható agyi vérátáramlás fokozódást mérik valamilyen képalkotó eljárás használatával. Az AZD gátolja a szénsav-anhidráz enzim működését a vesében, vörösvérsejtekben és a központi idegrendszerben, amelynek eredményeként hiperkapnia és acidózis jön létre. Felnőttekben az AZD és a hiperkapnia azonos mechanizmussal tágítja az agyi ereket, ez azonban újszülöttekben nem ismert. Kísérleteink második részében összehasonlítottuk a hiperkapnia és az AZD által kiváltott agyi érreakciók mechanizmusát újszülött malacokban.

A perinatális agyi vérellátási zavarok gyakori következménye az újszülöttkori epilepsziás rohamok kialakulása. Az újszülöttkori rohamok károsítják az agyi erek funkcióját, amely a késői posztiktális szakaszban jelentkezik. Habár a károsodás kialakulásának

mechanizmusa nem ismert, állatkísérletes eredmények kimutatták, hogy a posztiktális agyi érkárosodás ellen a hem-oxigenáz enzim által termelt szén-monoxid (CO) védelmet nyújt. A hem-oxigenáz fontos sejtszintű antioxidáns, amely elbontja a prooxidáns hem molekulát, miközben CO, antioxidáns hatású bilirubin és vas ionok keletkeznek. A CO tágítja az újszülött agyi ereket, valamint hem tartalmú enzimekhez kötődve igen alacsony koncentrációban számos kedvező hatást fejt ki: antioxidáns, gátolja az apoptózist és gyulladáscsökkentő hatású. A CO specifikus vizsgálatára lehetőséget nyújt a CO felszabadító molekulák használata (CORM). Ezért kísérleteink harmadik részében azt vizsgáltuk, hogy a CORM-A1 molekulával történő előkezelés kivédi-e az epilepszia agyi érfunkciót károsító hatását.

## **Célkitűzések**

Az agyi vérkeringés szabályozásának mechanizmusait az újszülött malacban számos tanulmányban vizsgálták mind élettani körülmények között, mind hipoxiás/iszkémiás károsodást követően. Ennek ellenére részleteiben nem ismert (1) a kapcsolat az agyi vérkeringés változásai, az oxigén ellátottság és az idegsejtkárosodás között, (2) fontos agyi érreakciók mechanizmusa, (3) az agyi erek kóros körülmények között kialakuló funkcionális károsodásának mechanizmusa. Habár az újszülött malac modell klinikailag releváns modell, kísérleteink célja nem terápiás vagy diagnosztikus javaslatok felállítása volt, hanem az agyi vérkeringésszabályozás szempontjából fontos élettani és kórélettani folyamatok vizsgálata kontrollált kísérleti körülmények között újszülött malacokban.

A tézisben bemutatott tanulmányok célkitűzései:

I. Megvizsgáltuk, hogy 10 perc aszfixiát követően a szobalevegővel (RA), illetve 100% O<sub>2</sub>-nel (O<sub>2</sub>) történő újraélesztés eltérően befolyásolja-e (1) az agy szövettani elváltozásait, (2) az agyi vérátáramlást a nagyagy- valamint a kisagykéregben, (3) a szisztémás keringési paramétereket.

II. Összehasonlítottuk a hiperkapnia és az acetazolamid (AZD) által kiváltott piális arteriola tágulat és agyi vérátáramlás növekedés mechanizmusát. Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja ezeket a reakciókat az (1) indometacin, (2) ibuprofen (két ciklooxygenáz gátló), (3) iszkémia/reperfúzió (I/R) és a (4) N- $\omega$ -nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME, nem szelektív nitrogén-monoxid szintáz gátló).

III. Vizsgáltuk, hogy a perifériáson bejuttatott CORM-A1 (1) képes-e CO-ot szállítani az agyszövetbe, (2) az agyi vérkeringésre gyakorolt hatásai megfelelnek-e a CO hatásainak, és (3) kivédi-e a kísérletes roham által okozott, későn jelentkező agyi érfunkció zavart.

## **Módszerek**

### **Kísérleti állatok**

Kísérleteinket 0-5 napos újszülött malacokon végeztük (1-2,5 kg). Minden eljárást a Szegedi Tudományegyetem vagy a Tennessee Egyetem Egészségügyi Központjának Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyezett. Az állatokat altatásához nátrium-tiopentált (45 mg/kg ip) vagy ketamin-acepromazin keveréket használtunk (33 mg/kg és 3,3 mg/kg im). Az anesztéziát  $\alpha$ -chloralose (30-40 mg/kg iv) adásával tartottuk fent. A femorális artériába és vénába egy-egy kanült helyeztünk, amelyen keresztül vérnyomást mértünk és vérgáz vizsgálathoz vért vettünk, valamint a kísérlet során alkalmazott gyógyszereket juttattuk be. Az állatokat mesterségesen lélegeztettük és a testhőmérsékletüket 37-38 °C között tartottuk. Az agyi iszkémiát a koponyaűri nyomás fokozásával és egyidejű vénás vérvétellel hoztuk létre. Az kísérletes rohamokat pancuroniummal izomrelaxált (0,2 mg/kg iv) állatokon bicuculline-nal (3 mg/kg ip) váltottuk ki.

### **Az agyi érreaktivitás mérése**

Az állatok koponyájába zárt koponyaablakot ültettünk be és intravitális videomikroszkópia segítségével mértük a piális arteriolák átmérőjét. A kísérletek során 1-3 arteriolát választottunk ki (60-100  $\mu$ m). Az érreaktivitás méréséhez élettanilag fontos agyi értágító stimulusokat és anyagokat használtunk, mint (1) hiperkapnia (10% CO<sub>2</sub> belélegeztetés), (2) AZD (10-20 mg/kg iv), (3) CO (10<sup>-7</sup>M-10<sup>-4</sup>M) (4) CORM-A1 (10<sup>-7</sup>M-10<sup>-4</sup>M), (5) bradikinin (10<sup>-5</sup>M), (6) izoproterenol (10<sup>-6</sup>M), (7) hemin (10<sup>-6</sup>M) és (8) nitroprusszid-nátrium (10<sup>-6</sup>M). Válaszként az 5-10 perc alatt megjelenő maximális értágulatot értékeltük.

### **Az agyi vérátáramlás mérése**

Az agyi vérátáramlást két csatornás lézer Doppler áramlásmérő segítségével mértük. A vérátáramlást a nagyagykéregben parietálisan illetve a kisagykéregben occipitálisan elhelyezett próbákkal regisztráltuk. Az eredményeket a kísérletek végén a Perisoft 1.30 program segítségével értékeltük ki.

### **Neuropatológiai pontszám**

Az agyi szövettani károsodás megítéléséhez a kísérlet végén az agyakat kivettük, majd 4% paraformaldehidben immerziósan fixáltuk. Az mintákat a frontális és temporális agykéregből, kisagyból, hippocampusból, bazális ganglionokból és a hídból metszettük ki és hematoxin-eozinnal festettük. Az idegsejtkárosodást két neuropatológus (Dr. Cserni Gábor és Bori Rita) egymástól függetlenül értékelte egy 5 fokozatú pontszámrendszer alapján.

## **CO koncentráció mérése: gázkromatográfia-tömeg spektrometria**

Az in vitro oldatok és az in vivo nyert mesterséges cerebrospinális folyadék (CSF) CO koncentrációját gázkromatográfia-tömeg spektrometria segítségével mértük. A mintákat a belső standardot ( $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$ , 1 mM) tartalmazó üvegcéskbe juttattuk és légmentesen lezártuk. Melegítés után ( $70^\circ\text{C}$ ) a gáztérből nyert mintából végeztük a CO koncentráció mérését.

### **Statisztikai analízis**

A csoportok közötti szignifikáns eltérések kimutatásához egy vagy két utas variancia analízist végeztünk, post hoc tesztként Dunnett vagy Student-Newman-Keuls tesztet használtunk. A csoporton belüli változások kimutatásához ismételt méréses variancia analízist és Tukey-Kramer tesztet alkalmaztunk.

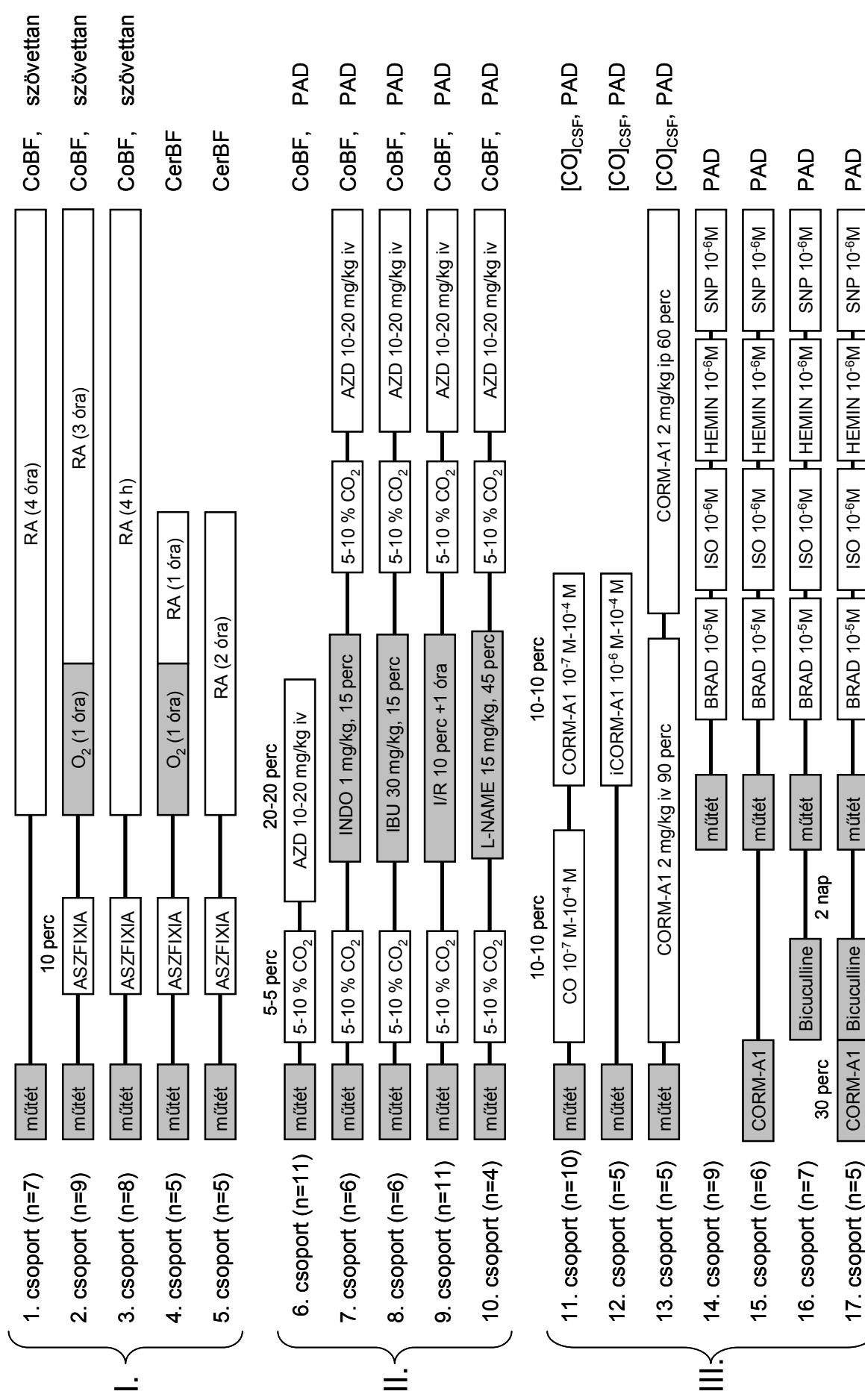
## **Eredmények és megbeszélés**

### **I. A szobalevegő és 100% O<sub>2</sub>-nel történő reventiláció hatásai**

Az élettani paraméterekben, mint a vérnyomás, szívfrekvencia és vérgáz értékek, nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. A vérátáramlás mind a nagyagykéregben, mind a kisagykéregben ~80%-kal csökkent az aszfixia alatt. A reventiláció során kezdeti reaktív hiperémia alakult ki, amelynek mértékét a szobalevegővel illetve 100% O<sub>2</sub>-nel történő lélegeztetés nem befolyásolta. A két vizsgált területet összehasonlítva azonban, jelentősen nagyobb mértékű reaktív hiperémia jött létre a kisagykéregben a nagyagykéreghez viszonyítva.

A szobalevegővel illetve 100% O<sub>2</sub>-nel történő lélegeztetés eltérően befolyásolta az idegsejtkárosodást a vizsgált agyterületeken. Az aszfixia hasonló mértékű károsodást okozott a frontális és a temporális kéregben mindkét reventilációs csoportban. Azonban a kisagy és a hippocampus területén a 100% O<sub>2</sub>-nel történő lélegeztetés jelentősen súlyosbította a neuronpusztulást. Ezzel szemben a bazális ganglionokban az aszfixia csak a szobalevegő-lélegeztetés esetén okozott jelentős károsodást. A hídban az aszfixia után nem alakult ki szignifikáns szövettani eltérés.

A 100% O<sub>2</sub>-nel történő reventiláció a szövettanilag kimutatható idegrendszeri károsodás szempontjából nem előnyösebb, mint a szobalevegő használata az újszülött malacokban. Az egyes agyterületek O<sub>2</sub>-toxicitás iránti érzékenysége számos tényezőtől függhet, pl a helyi vérátáramlás mértékétől. A reaktív hiperémia során az agyszövetben az újra megjelenő O<sub>2</sub>-ből jelentős mennyiségű oxigén-szabadgyök képződik, amely nagymértékben hozzájárul az idegsejtkárosodás kialakulásához. Feltételezhető, hogy minél nagyobb mértékű a reaktív hiperémia, annál jelentősebb az O<sub>2</sub>-túlkínálat, a szabadgyök



Kísérleti protokollok. Rövidítések: AZD: acetazolamid, BRAD: bradikinin, CerBF: kisagyi vérátáramlás, CoBF: nagyagykérgei vérátáramlás, [CO]<sub>CSF</sub>: a cerebrospinális folyadék szén-monoxid koncentrációja, CORM-A1: A1 típusú CO felszabadító molekula, iCORM-A1: inaktívált CORM-A1, I/R: iszkémia/reperfúzió, IBU: ibuprofen, INDO: indometacin, ISO: izoproterenol, L-NAME: N- $\omega$ -Nitro-L-arginine-metil-észter, PAD: piális arteriola átmérő, RA: szobalevegő, SNP: nitroruzzszid-nátrium

képződés és az idegsejtkárosodás, amely magyarázhatja a kisagykéregben megfigyelt eredményeinket.

## **II. A hiperkapnia és az acetazolamid által kiváltott agyi érreakciók**

A hiperkapnia koncentráció-függő piális arteriola tágulatot és nagyagykérgi vérátáramlás emelkedést hozott létre. Az AZD hasonló hatást fejtett ki, amely a maximumát 10-15 perccel a beadás után érte el (10 mg/kg iv), ez a hatás azonban további AZD bejuttatásával nem volt fokozható (20 mg/kg). Az AZD által kiváltott agyi érválasz nem érte el a 10% CO<sub>2</sub> hatását, ezért újszülöttekben az AZD valószínűleg alábecsüli az agyi erek CO<sub>2</sub> iránti válaszkészségét.

Ennek ellenére a hiperkapnia és az AZD valószínűleg azonos vagy hasonló mechanizmussal okoznak agyi értágulatot és vérátáramlás növekedést. A két anyag által kiváltott agyi érválaszokat az indometacin teljesen meggátolta, az iszkémia/reperfúzió jelentősen csökkentette, míg az ibuprofen és az L-NAME nem befolyásolta.

Az AZD enyhe artériás hipercapniát okoz, amely hozzájárulhat az agyi értágulat kialakulásához, de önmagában nem magyarázza a létrejöttét. Habár az AZD az agyszövetben acidózist hoz létre, a vér-agy gáton sokkal lassabban jut át, mint ahogyan az agyi érválaszok megjelennek. Ezért valószínű, hogy az AZD nem az agyi parenchymában, hanem vér-agy gáton kívül, az agyi erek endotheliumában nagy mennyiségben található szénsav-anhidráz enzimek gátlásán keresztül fejt ki a hatását.

## **III. Agyi érfunkció epilepszia és CORM-A1 kezelés után**

A CORM-A1 az agyfelszínére juttatva ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M), a periarachnoideális CSF-ben növeli a CO koncentrációját és a CO-hoz hasonlóan tágítja a piális arteriolákat. A CORM-A1 szisztémás beadását követően (2 mg/kg iv vagy ip) szintén emelkedik a periarachnoidális CSF CO koncentrációja és piális arteriolatágulat jön létre. Ennek a válasznak a maximuma 20-40 perc elteltével jön létre, és 60-90 perc elteltével a nyugalmi szintre áll vissza. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a CORM-A1 molekula képes CO molekulát szállítani az agyszövetbe, amely ott kifejti a CO biológiai hatásait.

A kísérletes rohamok csökkentik az agyi erek válaszkészségét, amely a késői posztiktális szakaszban jelenik meg. Két nappal a kísérletes rohamot követően az agyi erek bradikininnel, heminnel, és izoproterenollal kiváltható értágulata jelentősen csökkent a kontroll csoporthoz képest, míg a nitroprusszid-nátriumra adott válasz változatlan maradt. A CORM-A1 előkezelés (2 mg/kg 30 perccel a roham kiváltása előtt) jelentősen javította a piális arteriolák válaszkészségét, azonban a CORM-A1 önmagában nem befolyásolta az agyi

érreakciókat. Nem ismert, hogy a rohamok milyen mechanizmussal okozzák az agyi erek funkciózavarát. A rohamok során az idegsejtek metabolizmusa jelentősen fokozódik, amellyel azonban az agyi vérátáramlás emelkedése nem tart egyensúlyt. Ennek következményeként az agyszövet viszonylagos hipoperfúziója és mérsékelt reaktív oxigéngyök termelés jön létre, amely önmagában is az érreaktivitás károsodásához vezethet. Az érkárosodás késői megjelenése arra utal, hogy kialakulásához hozzájárulhat apoptózis vagy pedig idegrendszeri gyulladás is. A CO fokozhatja a rohamok alatt az agy vérellátását, gátolhatja az oxidatív stressz, apoptózis és gyulladás kialakulását, ezáltal javíthatja a posztiktális agyi érfunkciót.

## **Összefoglalás és következtetés**

A tézisek alapjául szolgáló tanulmányokban újszülött malacokban olyan kísérleti körülményeket hoztunk létre, amelyek az agyi vérkeringésszabályozás zavarát okozzák. Ezek az állapotok klinikailag relevánsak, hiszen az újszülöttekben agyi hipoxiás állapotok, mint pl aszfixia illetve agyi iszkémia, és a rohamok igen gyakran előfordulnak. Ezen állapotok következményeként hosszú távon fennálló idegrendszeri károsodás alakulhat ki, amelyet az agyi erek funkciózavara jelentősen súlyosbíthat.

A perinatális agykárosodást kiváltó állapot gyakran kórházi megfigyelés alatt álló újszülöttekben jön létre. Ilyen esetben a fenyegető agykárosodás gyakran megijósolható, és elegendő terápiás ablak állhat rendelkezésre diagnosztikai és terápiás eljárások elvégzésére, és a másodlagos károsodás kialakulásának megelőzésére. Ezek az eljárások azonnal elkezdődhetnek a megfelelő újraélesztési módszer megválasztásával. 2004-2005-ben, amikor kísérleteink első részét végeztük, az American Heart Association akkor érvényes ajánlása az újszülöttek újraélesztéséhez a lehető legmagasabb O<sub>2</sub> koncentráció biztosítását javasolta. Az American Academy of Pediatrics and the American Heart Association 2007-ben megjelent legújabb ajánlása szerint válogatott klinikai körülmények között az újraélesztés szobalevegővel is megkezdhető, illetve a 100% O<sub>2</sub> a megfelelő szaturáció elérése után szobalevegőre cserélendő.

A kísérletes körülmények között ígéretes neuroprotektív eljárások sajnos a klinikai gyakorlatban gyakran eredménytelennek bizonyulnak. Az agyi erek védelme hozzájárulhat ezek sikerének növeléséhez. Eredményeink szerint az AZD a felnőttekhez hasonlóan újszülöttekben is alkalmas lehet a cerebrovaszkuláris rezerv kapacitás mérésére. Ennek előnye lehet a hiperkapnia létrehozásával szemben, hogy a betegről nem kíván közreműködést, mint a lélegzet visszatartása. Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy az AZD alábecsülheti az



erek CO<sub>2</sub> iránti válaszkészségét. Kísérleteink során a CORM-A1 védelmet nyújtott a kysérletes rohamok által okozott agyi érkárosító hatásával szemben. A CORM-A1 ezért ígéretes kiindulási alapot jelenthet további, agyi ereket védő szerek kifejlesztéséhez.

Kísérleteink új eredményekkel segítik az agyi vérkeringés szabályozásának megismerését hipoxiás és epilepsziás újszülöttekben.

## **Köszönetnyilvánítás**

Tisztelettel köszönöm témavezetőmnek, Prof. Bari Ferencnek, hogy lehetővé tette számomra a tudományos kutatómunka végzését. Segítőkézségével, ösztönző javaslataival és mindennapos támogatásával segített, hogy megismerjem az agyi vérkeringés kutatásának alapjait, és útmutatást nyújtott a kísérletek elvégzésében. Külön köszönöm neki a disszertáció elkészítésében nyújtott segítségét és az ezzel kapcsolatos ügyek intézését. Köszönöm Dr. Domoki Ferencnek, hogy megtanította nekem azokat a műtéti és kísérleti technikákat, amelyekre a munkám során szükségem volt. Köszönöm neki a közös munka során nyújtott szakértő segítségét és a kéziratok elkészítését, amelyek a jelen tézisek fontos részét képezik. Szeretném megköszönni Prof. Helena Parfenovanak és Prof. Charles W. Lefflernek, hogy dolgozhattam a laboratóriumukban az Amerikai Egyesült Államokban, Tennessee-ben, a memphisi Egészségtudományi Központ Élettani Intézetében. Öszintén köszönöm Tóth-Szüki Valériának a kifogyhatatlan türelmét és a kiváló technikai és emberi támogatást. Végül köszönetet mondok barátaimnak és kollégáimnak az elmúlt években tanúsított barátságukért és építő javaslataikért.

## **A disszertáció alapjául szolgáló kéziratok**

I. Domoki F, Zimmermann A, Cserni G, Bori R, Temesvari P, Bari F. Reventilation with room air or 100% oxygen after asphyxia differentially affects cerebral neuropathology in newborn pigs. *Acta Paediatr.* 2006;**95**:1109-15. IF: 1.143

II. Zimmermann A, Leffler CW, Tcheranova D, Fedinec AL, Parfenova H. Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule, CORM-A1, against seizure-induced neonatal vascular injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2007. IF: 3.561

III. Domoki F, Zimmermann A, Toth-Szuki V, Busija DW, Bari F. Acetazolamide induces indomethacin and ischaemia-sensitive pial arteriolar vasodilation in the piglet. *Acta Paediatr.* 2008;**97**:280-4. IF: 1.297

IV. Zimmermann A., Domoki F, Bari F. Seizure-Induced Alterations in cerebrovascular function in the neonate. *Dev Neurosci* . 2008;**371**: In Press IF: 2.691