

**NMDA- és aszfixia által létrehozott megváltozott neurovaszkuláris válaszkészség
az újszülött malac agykéregben, adatok az újszülöttkori hipoxiás-iszkémiás
enkefalopátia pathomechanizmusához**

Ph.D. értekezés tézisei

Remzső Gábor, MS



Témavezető:

Dr. Domoki Ferenc

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

2021

Szeged

BEVEZETÉS

A perinatális aszfixia (PA) jelentős újszülöttkori mortalitáshoz, vagy a túlélőkben hipoxiás-izskémiás encefalopátia (HIE) kialakulásához vezethet. A terápiás testhűtés (hipotermia) alkalmazása ellenére a HIE sok újszülöttben tartós neurológiai maradványtüneteket eredményezhet, mivel a hipotermia önmagában gyakran nem elegendő, hogy teljes mértékben kivédje a HIE következtében létrejövő neuronális károsodást. A hipotermiát kiegészítő terápiák kidolgozásához elengedhetetlen a HIE kialakulása mögött álló neuronális és vaszkuláris pathomechanizmusok vizsgálata. A munkacsoportunkban használt újszülött malac az egyik legmegfelelőbb nagyállat modell a PA/HIE preklinikai transzlációs kutatásokra. A tézisben két fő problémára fókuszáltunk, nevezetesen az agyi intersticiális pH (pH_{agy}) megváltozásának szerepére, valamint a PA illetve a HIE következtében létrejövő neurovaszkuláris egység diszfunkciójának a neuronális sérülésben betöltött mechanizmusának megismerésére.

A PA/HIE alatt a pH_{agy} elsődleges és másodlagos változásai hozzájárulnak a neuronális sérülés kialakításához az újszülött agykéregben. Ugyan fiziológiás körülmények között a pH_{agy} szorosan szabályozott, azonban a pH_{agy} eltérései nagyban befolyásolhatják a neuronok excitabilitását. Rágcsálókön végzett kísérletekből már jól ismert, hogy a pH_{agy} változásai különböző típusú ionszarnák működését modulálhatják. Ismert, hogy az acidózis gátolja, míg az alkalózis facilitálja az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokat (NMDAR) a patkány hippocampusban. Továbbá a pH_{agy} módosíthatja a feszültség-függő Na^+ , K^+ és Ca^{2+} csatornák ionáramait patkány hippocampusban. Újszülött patkányokban végzett pH_{agy} mérések azt mutatják, hogy a PA-indukált acidózis a reventillációt követően a pH_{agy} alkalikus irányba történő elmozdulását eredményezi, mely szoros összefüggésben áll a megjelenő görcsökkel. Az intermittens aszfixia a neuronok hiperexcitabilitásához vezet (alacsonyabb görcs küszöb), mely spontán megjelenő görcsöket eredményez. A görcsök gátolhatók voltak a pH_{agy} normál szintre való visszatérésének lassításával, 5% CO_2 lélegeztetéssel. Tengerimalacokban is bizonyították, hogy ez az eljárás, az ún. fokozatos visszatérés a normokapniához előnyös hatást gyakorol az agyi metabolikus acidózisra, valamint az oxigén és laktát szintre egyaránt. Mindemellett, nagyon kevés információ áll rendelkezésre a PA/HIE akut és szubakut fázisainak pH_{agy} változásairól nagy-állat modellekben.

A neurovaszkuláris egység, mint fogalom, magában foglalja a neuronális és vaszkuláris elemek strukturális és funkcionális kapcsolatát, amely biztosítja azt a megfelelő szöveti perfúziót, mely elengedhetetlen a neuronális aktivitás metabolikus szükségletének fenntartásához. A

neurovaszkuláris egység diszfunkciója kialakulhat hipoxiás-izskémiás (HI) sérülés következtében, beleértve a PA-t is, melyek bizonyítottan megváltoztatják a mikrovaszkuláris reaktivitást pl. hiperkapnia vagy NMDA stimulációt követően. A glutamáterg mechanizmusok fontos szerepet játszanak a neurovaszkuláris csatolásban, biztosítva a lokális perfúzió és a neuronális aktivitás kapcsolatát. Újszülött malacokban számos tanulmány foglalkozott az NMDA-indukált piális arteriola dilatáció mechanizmusának-, az agykérgi véráramlás fokozódásának-, valamint a neurovaszkuláris válasz attenuációjának a vizsgálatával, PA/HIE vagy más típusú HI stresszt követően. Újszülött malacokban az NMDA stimulációt követő vaszkuláris válasz feltételezhetően neuronális nitrogén oxid szintáz (nNOS) aktivitás függő, míg a válasz attenuációja reaktív oxigéngyökök (ROS) termelődéséhez köthető a reoxigenizáció/reventilláció periódusa alatt. Az NMDAR-ok nem kizárólag a célpontjai, hanem a mediátorai is a neurovaszkuláris egység diszfunkciójának. Az agykérgi terjedő depolarizáció (SD) hulláma majdnem teljes mértékű neuronális depolarizációt eredményez, mely a neuronális aktivitás terjedő depressziójával társul, neurovaszkuláris egység diszfunkciót és megváltozott mikrovaszkuláris reaktivitást indukálva ezzel. Egyetlen SD hullám is képes a hiperkapniára adott mikrovaszkuláris válasz teljes megszüntetésére. Az NMDA topikálisan az agykéreg felszínére juttatva képes SD kiváltására ráécsáló modellekben. Újszülöttekben – beleértve az újszülött malacokat is – SD még a funkcionális NMDAR-ok jelenléte mellett sem váltható ki. Az NMDAR aktiváció és a neurovaszkuláris diszfunkció esetleges kapcsolata az újszülöttekben azonban még feltérképezésre vár.

CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat fő céljai közt szerepel a HIE kórélettani mechanizmusok tanulmányozása transzlációs nagyállat modellünkben, mely lehetővé teszi akár a HIE klinikai kezelésében releváns neuroprotektív terápiák kifejlesztését. Kísérleti célkitűzéseink a következők voltak:

1. Kvantitatívan meghatározni a PA pH_{agy} -ra gyakorolt hatását aszfixia és a HIE kialakulásának szubakut fázisa alatt, mely lehetővé teszi a pH_{agy} változások jelentőségének megértését, valamint ráécsálókon végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítását PA/HIE modellünkkel. Meg kívántuk mérni a PA-indukált acidózis respiratórikus komponensének (hiperkapnia) mértékét is.

2. Meghatározni, hogy az NMDA stimuláció önmagában (generalizált glutamáterg aktivációt szimulálva PA nélkül) hatással van-e a neurovaszkuláris egység működésére, hiperkapnia-indukált vazodilatációt alkalmazva a cerebrovaszkuláris reaktivitás tesztelésére. Az NMDA-indukált neurovaszkuláris diszfunkció bizonyítását követően megvizsgálni, hogy a nNOS aktivitás szerepet játszik-e a mechanizmusban.
3. A második pont eredményeit kibővítve, a cerebrokortikális neuronális aktivitás és kapcsolatrendszer elektrofiziológiai tulajdonságainak feltérképezése újszülött malacban. Tanulmányoztuk, hogy az NMDA képes-e megváltoztatni a spontán- és a hiperkapnia-indukált elektromos aktivitásokat, valamint ezek együtt jelentkeznek-e a cerebrovaszkuláris reaktivitás megváltozásával.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és alkalmazott műtéti eljárások

Az újszülött malacokat Na-thiopentállal altattuk el. Az állatokat szervo-kontrollált melegítő párnára helyeztük, maghőmérsékletüket a fiziológiás intervallumban tartva (38.5 ± 0.5 °C). A malacokat tracheosztómián keresztül mesterségesen, párástított orvosi levegővel lélegeztettük, amit szükség esetén oxigénnel egészítettünk ki (FiO_2 : 0.21-0.25), az alábbi légzési paramétereket alkalmazva: respirációs ráta (RR): 30-35/perc; belégzési csúcsnyomás (peak inspiratory pressure; PIP): 12-14 cmH₂O. Aszeptikus körülmények között katétert helyeztünk a jobb oldali femorális vénába, intravénás morfin és midazolam anesztézia/analgézia, valamint szupportív folyadékterápia alkalmazására. Egy második katétert helyeztünk a jobb oldali carotis artériába, melyen keresztül vérmintákat vettünk, valamint monitoroztuk az artériás középnyomást (mean arterial blood pressure; MABP) és szívfrekvenciát (heart rate; HR). A vérminták analizését epoc[®] vérgáz-analizátorral végeztük, vizsgálva a vér pH-ját, vérgáz-, elektrolit- és metabolit értékeit. A perifériás oxigén szaturációt (SpO₂) pulzoximéter segítségével monitorizáltuk.

A műtéti eljárást követően az állatok fejét rozsdamentes acél sztereotaxiás állványon rögzítettük. A lézer folt-interferenciás kontraszt képalkotáshoz (Laser-speckle contrast imaging; LSCI) rozsdamentes acél koponyaablakot implantáltunk a parietális kéreg fölé. Az elektrofiziológiai, valamint az agyi intersticiális pH mérésekhez nyitott koponyaablakot alkalmaztunk a bal oldali parietális kéreg fölött, melyen keresztül az elektródokat az agykéregbe vezetjük. A szubarachnoideális teret melegített (37 °C), mesterséges cerebrospinalis folyadékkal (aCSF) töltöttük fel, melyet 6.3% O₂, 6.2% CO₂ és 87.5% N₂ tartalmú gázkeverékkel ekvilibráltunk. A műtéti eljárásokat követően az állatokat a két vizsgálat-sorozatban 2 ill. 4 csoportra osztottuk:

- 1.1 GrHyp csoport (n=3): normoxia mellett gradált hiperkapniát idéztünk elő, a CO₂ szint 5%-os lépcsőzetes növelésével (0%-tól 20%-ig).
- 1.2 Asph csoport (n=13): hipoxiás-hiperkaniás gázkeverékkel (20% CO₂ és 6% O₂, RR=15/perc) aszfixiát idéztünk elő, majd az agykérgi pH változásokat különböző időablakokban regisztráltuk. (alap, PA és a reventilláció első 4 órája (n=6), reventilláció 8-14 órája (n=8), és a 20-24 órája (n=3)). A HIE kialakulását korábbi vizsgálatunkban már alkalmazott neuropatológiai analízissel igazoltuk.

- 2.1 Kontrol csoport (n=6): ismételt gradált hiperkapniát idéztünk elő (5% és 10% CO₂) NMDA stimuláció nélkül
- 2.2 NMDA csoport (n=14): a két ismételt gradált hiperkapnia között növekvő koncentrációjú (0.1 és 1 mM) NMDA-t helyeztünk topikálisan az agykéregre, zárt koponya ablakot alkalmazva az agykérgi váraramlás (cortical blood flow; CoBF) tanulmányozására (n=7), valamint nyitott koponya ablak segítségével nyomon tudtuk követni a lokális mezőpotenciálok (LFP) változásait (n=7).
- 2.3 MK-801 + NMDA csoport (n=4): az NMDA csoportban használt stimulusok alkalmazása mellett az agykérget NMDAR antagonistá MK-801-el (0.1 mM) előkezeltük, majd NMDA-val együtt alkalmaztuk
- 2.4 AAAN + NMDA csoport (n=7): szelektív nNOS inhibitor (AAAN) beadását követően az NMDA csoport stimulusait alkalmaztuk

2. pH_{agy} mérések

Méréseinket saját készítésű Faraday kalitka alatt pH-szenzitív mikroelektrodokkal, 4 Hz mintavételi frekvencián végeztük. Az elektrodokat sztereotaxiás manipulátorokkal rögzítettük, majd minden kísérletet megelőzően 3 különböző puffer oldattal (pH: 6.10, 7.10, és 8.10; 38°C) kalibráltuk. A pH-szenzitív és referencia elektrodokat 1-2 mm mélyen az agykéregbe szúrtuk és egy Ag/AgCl föld elektródot helyeztünk a skalp alá. A jeleket saját készítésű elektrométerrel, 16-bites analóg-digitális (AD) konverterrel és WinEDR szoftver segítségével, vagy mikroszenzor multiméterrel és SensorTrace Logger szoftverrel regisztráltuk. Méréseinket offline értékeltük ki: a kalibráló oldatok jeleit görbére illesztettük lineáris regresszió analízissel, majd pH jellé konvertáltuk lineáris interpoláció segítségével. A technika 3-4 órán keresztül teszi lehetővé a stabil mérést, ezért különböző állapotokban, különböző időablakokban végeztük a regisztrációkat.

3. LSCI mérés és analízis

Az agy felszínét egy lézer dióda által emittált, közel infravörös polarizált fényvel világítottuk meg ($\lambda=808$ nm, 200 mW). A képeket egy monokróm kamerával rögzítettük (1 Hz, 1 ms), amely polarizáló és szinkonverziós filterrel van ellátva. Az LSCI analízist offline végeztük LabVIEW

segítségével. A kontraszt térképeket a nyers speckle képekből hoztuk létre, 5x5 pixel nagyságú (~1200 μm^2) területek kiválasztásával. Minden egyes kép esetében az $1/\tau$ értékeket az alapvonal százalékában normalizálva fejeztük ki. A piális arteriola átmérőket azokban az időpontokban határoztuk meg, amikor a CoBF az egyes stimulusok alatti maximumát elérte. A jobb felbontás elérése érdekében 30 képet átlagoltunk ki, majd a zaj mértékének csökkentésére Otsu filterrel végeztük a szűrést. Az arteriolák belső átmérőjének a meghatározásához euklideszi távolság mérést használtunk MATLAB segítségével. Az arteriola átmérők adatait az alapátmérő százalékában normalizálva fejeztük ki, valamint a 4 különböző arteriola értékeit állatonként átlagoltuk.

4. Neurofiziológiai mérések

Az elektrofiziológiai méréseket 16-csatornás akut, egy szárú sík elektróddal végeztük. Az adatok felvétele az RHD2000-es szériájú Intan felvevőrendszerrel történt. Adataink regisztrációját 20 kHz mintavételi frekvenciával végeztük, a jeleken pedig 1-9000 Hz közti sávszűrést végeztünk. Az adatok analizését offline végeztük MATLAB környezetben, a megfelelő beépülő toolbox-ok (Chronux, FMAtoolbox) és saját scriptek segítségével. Az LFP jeleket frekvenciasávokra bontottuk, majd Gyors Fourier Transzformáció (FFT) segítségével meghatároztuk a teljesítménysűrűség spektrumukat (power spectral density; PSD). Az egyes frekvenciasávok PSD-ét összegeztük. A PSD-at átlagoltuk és az alap százalékában fejeztük ki. Az LFP inverz problémájának megoldására kiszámoltuk az LFP másodlagos térbeli deriváltját, az áramforrás sűrűséget (current source density; CSD), felfedve ezzel, hogy a különböző források hogyan járulnak hozzá a jelhez. A számításokhoz a standard CSD metódust használtuk. A spike sortingot a Klusta programcsomaggal végeztük. Az egy-sejt aktivitások az ún. „threshold crossing” alapú algoritmussal lettek azonosítva. A spike-okat automatizált klaszterelés rendezte csoportokba, melyet a klaszterek manuális szortírozása követett a phy KwikGUI szoftver segítségével. Az interneuronnak vagy piramisjeletnek vélt neuronokat a hullámforma karakterisztikájuk és autokorrelogramjuk (ACG) alapján azonosítottuk, majd kereszt-korrelogramjukat (CCG) megvizsgálva feltérképeztük a sejtek közti monoszínaptikus kapcsolatokat.

5. Statisztika

Az LSCI és az elektrofiziológia statisztikai analizését IBM SPSS 22-ben végeztük, ismételt méréses egy-, vagy kétszemponos ANOVA segítségével, valamint a megfelelő *post hoc* tesztet alkalmazva (Tukey és Bonferroni). Minden eredmény az átlag±szórást mutatja az alaphoz viszonyítva. A Z-értékek kiszámításához a MATLAB statistics toolboxát használtuk. A relatív PSD változásokat $Z \geq \pm 2^*$ és $Z \geq \pm 4^{**}$ esetekben ítéltük szignifikánsnak. A pH, a hemodinamikai- és a fiziológiai paraméterek analízise SigmaPlot-tal vagy MATLAB-al történt. Minden esetben az adatok átlag±SEM formájában kerültek prezentálásra. Ismételt méréses, egy szemponos ANOVA-t alkalmaztunk, SNK *post hoc* tesztel. A P_aCO_2 és a pH_{agy} közti korreláció számítását a MATLAB polinom görbe illesztésével végeztük ($p < 0.05^*$ és $p < 0.01^{**}$).

EREDMÉNYEK

1. A PA/HIE és a gradált hiperkapnia hatása a fiziológiás paraméterekre

Az 5-10% CO_2 -al történő lélegeztetés gradált hiperkapniát eredményezett, mely hasonlóan mutatkozott minden kísérleti csoportban, mind az LSCI, mind pedig az elektrofiziológiát illetően. Az artériás pCO_2 lépcsőzetes emelkedése a markáns respiratórikus acidózissal és a plazma HCO_3^- szintjének enyhe emelkedésével egyidőben jelentkezett, azonban az artériás pO_2 , a vér oxigén szaturációja, az MABP és a HR mindvégig a normál tartományban maradtak. A stimulus nagy mértékben ismételhetőnek bizonyult, mert a második 5-10% CO_2 -dal történő lélegeztetéssel közel azonos vérgáz értékeket kaptunk, mint az első során.

A 20 perces aszfixiás periódus alatt az O_2 szaturáció 30% alá esett, a HR 140 l/perc-ről közel 200 l/perc-re nőtt az első két percben, ami ezt követően nem mutatott számottevő változást, míg az MABP válasza bifázikus volt, egy tranzien emelkedéssel kb. 90 Hgmm-ig, amit egy lassabb, alap érték alá való csökkenés követett. Az oxigén szaturáció 80% fölé történő gyors emelkedése a reventilláció első 2-3 percében megfigyelhető volt, ezzel párhuzamosan a HR (240 l/perc) és az MABP (80 Hgmm) tranzien emelkedése volt tapasztalható, melyek fokozatosan visszatértek a normál értékekre.

A fiziológiás paraméterek hosszan tartó monitorizálása jól tükrözi a PA és a reventilláció hatásait. A vér hemoglobin koncentrációja, a maghőmérséklet, O_2 szaturáció, MABP és a HR a normál tartományban voltak a PA-t megelőzően, valamint ezen értékek nem különböztek

szignifikánsan az alap értékektől a túlélés teljes időtartama alatt sem. A PA végén rögzített pulzoximetriás adatok és az artériás vérgáz analízis szintén megerősítette a centrális hemoglobin deszaturációt ($94\pm 4\%$ -ról $13\pm 4\%$ -ra), melyet súlyos acidózis, hypoxia és hiperkapnia kísért. Az artériás vér pH (pH_a) 7.53 ± 0.03 -ról 6.79 ± 0.02 -re esése jelentősnek mutatkozott, mellyel párhuzamosan a P_aCO_2 160 ± 6 mmHg-ig történő emelkedése volt megfigyelhető. A vér glükóz és laktát szintje kiemelkedően megnőtt, bizonyítva ezzel a PA-ra adott metabolikus választ. A 17.4 ± 1.5 mmol/L-es bázis deficit, a bikarbonát koncentráció csökkenése, valamint az alacsony pH_a (6.79) értékek a PA végén jól mutatják, hogy az aszfixia mértéke messzemenően megfelel a humán újszülötteknél a súlyos aszfixia diagnózisának fellállításához szükséges kritériumoknak ($pH < 7.0$ és bázis deficit ≥ 12 -16 mmol/L). Reventillációt követően a normoxia meglehetősen gyorsan helyreállt az artériás vérben, de a P_aCO_2 szint magasabb értékeken maradt, bár ez a változás csak a PA-t követő 4. órában mutatott szignifikáns eltérést. A 4. órára a bázis deficit normalizálódott, a pH_a visszatért 7.39 ± 0.02 -re, mely a malacokban normálisnak tekinthető. Hasonlóképpen a vér glükóz és laktát szintje a 4. órára szintén visszatért a kezdeti értékekre, bár mindkettő még statisztikailag szignifikáns elevációt mutatott a PA-t követő 1. órában.

2. A pH_{agy} változása a HIE kialakulása- és gradált normoxiás hiperkapnia során

A gradált hiperkapnia létrehozására irányuló kísérletek nagy jelentőséggel bírnak, mert a PA alatt bekövetkező pH_{agy} csökkenés respiratórikus komponensét meg tudtuk határozni. A belélegeztetett 5%-os CO_2 lépcsőzetes növelésével egy idejűleg lépcsőzetes pH_{agy} csökkenés volt tapasztalható. Az artériás vérgáz analízis hasonló mértékű fokozatos pH_a csökkenést mutatott, így a pH_{agy} és a pH_a közti különbség változatlan maradt a hiperkapnia alatt. A maximális változások a 20% CO_2 -dal történő lélegeztetés során voltak megfigyelhetőek, amely során a pH_a 7.52 ± 0.06 -ról 6.98 ± 0.02 -ra, míg a pH_{agy} 7.32 ± 0.01 -ről 6.77 ± 0.02 -re esett. A pH_{agy} és a pH_a változásai teljes mértékben normalizálódtak a normokapnia visszatérésével.

A PA indukciója pH_{agy} csökkenést eredményezett, mely kiegyenlítőds nélküli csökkenést mutatott a 20 perces inzultus alatt, így a pH_{agy} az aszfixia végére 7.21 ± 0.03 -ról 5.94 ± 0.11 -re esett le. Reventillációt követően a pH_{agy} 29.4 \pm 5.5 perc alatt érte el a 7.0 értéket, mely tovább stabilizálódva elérte a közel kiindulási értéket. A pH_{agy} a 2. órát követően kis mértékben a kezdeti értékek alatt maradt (átlagosan 0.10 ± 0.02 pH egységgel), nem mutatva további markáns változást a 24 órás obszervációs periódus alatt. A neuropathológiai analízis megerősítette a HIE kialakulását, azáltal, hogy minden vizsgált agykérgi régióban, a hippocampus CA1-es régiójában,

a thalamusban és a putamenben is középsúlyos/súlyos neuron károsodást eredményezett. Ezen eredményeink megerősítik saját korábbi, ugyanazon PA alkalmazásával kapott eredményeinket.

3. Az agykérgi mikrovaszkuláris válasz gradált hiperkapniára és NMDA stimulációra

Az LSCI analízis lehetővé tette a kérgi perfúzióról alkotott két dimenziós térkép létrehozását, mely a parenchimális perfúzió és a piális arteriola átmérők meghatározására egyaránt szolgált. A gradált hiperkapnia első alkalmazása az összes csoportban hasonló mértékű CO₂ koncentrációfüggő CoBF növekedést eredményezett, valamint a CoBF maximális értékei, az integrált hiperémiás válasz és a piális arteriola átmérő változásai is hasonló értékeket mutattak. 0.1 mM NMDA topikális alkalmazása szignifikáns CoBF (151±14%, alap %-a) emelkedést és arteriola átmérő dilatációt (138±31%, alap %-a) eredményezett, mely 3-4 perc alatt elérte a maximumot. A koponya ablak aCSF-sel történő átmosására a megnövekedett CoBF visszatért a kiindulási szintre. A stimulust 1 mM NMDA-val megismételve csak kisebb mértékben tapasztaltunk emelkedést mind a csúcs CoBF (172±23%), a teljes CoBF és az arteriola átmérő (145±20%) tekintetében, az NMDA kimosását követően ezek a változások reverzibilisnek bizonyultak. Az NMDAR antagonistá MK-801 topikális applikációja nem volt hatással az alap CoBF-re, azonban NMDA-val együtt alkalmazva teljes mértékben megszüntette az NMDA-ra adott hiperémiás és piális arteriola választ. A szelektív nNOS inhibitor szisztémás alkalmazása nem volt hatással a CoBF változásra, azonban szignifikáns piális arteriola dilatáció csökkenést eredményezett NMDA jelenlétében. A kontrol csoportban a második gradált hiperkapniára adott CoBF válasz az elsővel azonos mértékűnek mutatkozott, a maximális és az integrált CoBF válasz szintén hasonló eredményt adott, a cerebrovaszkuláris reaktivitás pedig mindkét CO₂ stimuláció esetén megtartott maradt. Ezzel éles ellentétet mutat az NMDA kezelt csoportban tapasztalt cerebrovaszkuláris reaktivitás, mely a gradált hiperkapnia második alkalmazásakor teljes mértékben megszűnt. MK-801-el történő előkezelés és NMDA-val történő koapplikáció meggátolta a hiperkapniára adott CoBF válasz attenuációját, így a cerebrovaszkuláris reaktivitás prezervált maradt. Az nNOS inhibitorral kezelt csoportban a hiperkapniára adott CoBF válasz gyengült, de az NMDA nem szüntette meg teljes mértékben, így a cerebrovaszkuláris reaktivitás részben megtartott maradt (68±35%).

4. Neurofiziológiai változások gradált hiperkapniára és NMDA stimulációra

A hiperkapnia indukciója 5% CO₂-dal először növekedést majd csökkenést eredményezett a PSD-ben, legfőképpen a delta és theta tartományban. A legnagyobb növekedés a delta esetében 100-400 µm agykérgi mélységben volt megfigyelhető, míg a theta esetében 100-600 és 1000-1200 µm mélyen. Az ezt követő PSD csökkenés a mélyebb kérgi rétegekben kezdődött, fokozatosan haladva a felszínes rétegek felé. 10% CO₂ esetében a PSD tovább csökkent mind a delta, mind a theta tartományban. Ez a depresszió normokapnia hatására nagy mértékben reverzibilisnek mutatkozott. NMDA stimulációt követően a gradált hiperkapniára adott válaszok jelentősen eltértek, legfőképpen a korai theta PSD növekedés maradt el. A delta PSD szignifikánsan megváltozott, valamint az LFP mintázat dezorganizációt mutatott.

1 mM NMDA szelektíven növelte a delta PSD-t kizárólag az agykéreg felsőbb rétegeiben (100-700 µm), ezzel párhuzamosan a theta PSD szuppresszáldott. Ez a karakterisztikus delta tartománybeli változás egy kb. 2.5 Hz-es delta-oszcilláció megjelenésével volt jellemezhető, mely még 600 µm mélyen is kifejezett volt. A CSD analízis rávilágított, hogy az NMDA szignifikánsan megváltoztatta az áramforrás és süllyedés (source and sink) méreteit, valamint először az agykéreg I., majd II/III. és IV. rétegeit aktiválta. Ez az NMDA-indukált aktiváció a delta sávra korlátozódott. Az azonosított neuronok alacsony frekvenciájú tüzelést mutattak (0.3-3 Hz). Az ACG-kel azonosítani tudtuk a parietális kéreg főbb sejt típusait, a gyorstüzelő piramis sejteket, szabályosan tüzelő piramis sejteket és interneuronokat. A CCG-k segítségével azonosítani tudtuk a legfőbb sejt kapcsolatokat is, melyek főként excitatórikus kapcsolatok voltak, 3-4 ms latenciával. Csak néhány gátló, reciprok vagy serkentő/gátló kapcsolatot sikerült megfigyelni a neuronok közt. A gradált hiperkapnia és az NMDA növelte a tüzelési rátát, főleg a II/III. és a IV. rétegekben, egészen 900 µm mélységig. Az azonosított 164 sejt kapcsolat 71%-a a II/III. réteggel volt asszociált, beleértve az intralamináris sejt kapcsolatokat is.

DISZKUSSZIÓ

A jelen tanulmány legfőbb eredményei a következők:

1. PA/HIE modellünk jól mutatja a közepsúlyos/súlyos HIE sérülés legfőbb jeleit. A normoxiás hiperkapnia lehetővé tette a PA respiratórikus komponensének meghatározását, mely $\approx 40\%$ -ban felelős a létrejövő acidózis kialakításáért. Az agykérgi pH 6.0 alá esett a PA következtében, a létrejövő acidózis ≈ 0.8 pH egységgel alacsonyabb szintet ért el az agyban, a

vérhez képest. A reoxigenizációt követően az agykérgi pH stabil maradt a 24 órás obszervációs periódus végéig, anélkül, hogy bármilyen pH eltolódást észleltünk volna.

2. A gradált hiperkapnia koncentráció-függően növelte a CoBF-t, melyet az NMDA megszüntetett. Az MK-801 teljes mértékben, míg az AAAN részlegesen kivédte a hemodinamikai válasz attenuációját, mely bizonyítja az NMDAR-ok és a nNOS aktiváció szerepét a hatás közvetítésében.
3. Ismételt hiperkapnia során az LFP delta és theta sávjainak gátlása összekapcsolódott a csökkent cerebrovaszkuláris válaszokkal. Az NMDA stimuláció 2.5 Hz-es delta-oszcillációt eredményezett 500-700 μm mélységben is, rámutatva ezzel az NMDA fő célpontjainak lokalizációjára.

pH_{agy} acidózis hiperkapnia, aszfixia és a HIE kialakulása során

Korábbi tanulmányokból megállapíthatjuk, hogy a hiperkapnia mértéke, a vér glükóz szintje és az agyi véráramlás nagysága is felelős lehet az aszfixia alatti agyi acidózis kialakulásáért. A humán és malac PA során megfigyelt P_aCO₂ 140-160 mmHg-re történő emelkedése normoxiás körülmények között (önmagában) felelős lehet az agyi intracelluláris pH (pH_i) 6.5-6.6-ig történő csökkenéséért. Jelen kísérleteink bizonyítékul szolgálnak, hogy a 20% CO₂ normoxiás körülmények között, önmagában (P_aCO₂: 120 mmHg) képes a pH_{agy} 6.8-ig történő csökkentésében. Lineáris regressziót alkalmazva meghatároztuk, hogy a létrejövő hiperkapnia (P_aCO₂: 160 mmHg esetében) a pH_{agy} 6.5-ig történő csökkenését eredményezi, mely összhangban áll a korábbi tanulmányok eredményeivel. A PA alatti nagyobb mértékű acidózis főleg az anaerob glikolízis következtében termelődő laktátnak köszönhető. A glükóz felvételének sebessége a hipoxiás agyba határozza meg a glikolízis mértékét, melynek csökkenése az agyi véráramlás vagy a vér glükóz szint csökkentésével gátolhatja az acidózis kialakulását. Korábbi PA modellünkben jelentős agyi iszkémia nem alakult ki, mivel az állatok többségében a 20 perces PA alatt az MABP nem érte el a véráramlás autoregulációjának alsó küszöbét. Tehát, modellünk feltehetően jól reprezentálja a PA-nak azt az akut fázisát, amikor még a kardiovaszkuláris adaptációs mechanizmusok kimerülése előtt a legjelentősebb mértékű pH_{agy} változások történnek meg.

Akut PA alatt, valamint reventillációt/reoxigenizációt követően a pH_{agy} változásának fontos kórélettani szerepe van. Korábbi tanulmányok leírták, hogy malacban a pH_{agy} stabil marad a PA-t követően, azonban ez az obszervációs periódus csak 4 órán át tartott. Mi ezzel szemben az obszervációs periódust 24 órára hosszabbítottuk meg. PA/HIE malac modellünkben azonban a

PA-t követő 24 óra alatt sem sikerült jelentős másodlagos pH_{agy} változást kimutatni. Eredményeinket alátámasztja egy korábbi, malacokkal végzett mágneses rezonancia spektroszkópia (MRS) tanulmány, ahol a HI vagy PA stresszt követően 24 órán át történt az agyi pH_i monitorizálása. Szeretnénk azonban kihangsúlyozni, hogy malac modellünk kizárólag a HIE-n átesett újszülöttek egy kisebb csoportját reprezentálja, akik a respiratorikus támogatás miatt normokapniások maradnak. Spontán légző, hiperventilláló újszülöttekben hipokapnia alakulhat ki, mely pH_{agy} emelkedést eredményez, a hipokapnia pedig ismerten a neurológiai károsodás romlásának egyik független rizikó faktora. Malacok esetében a középsúlyos hipokapnia önmagában is képes az agyi perfúzió csökkentéséhez, mely aszfixia hiányában is pH és laktát szint emelkedéshez vezet. Eredményeink azt sugallják, hogy a normokapnia/enyhe hiperkapnia fenntartásának szerepe lehet a pH_{agy} másodlagos megváltozásának a gátlásában. Az azonban további kutatásokat igényel, hogy a PA-t követően a fokozatos visszatérés a normokapniához hasonló jótékony hatással van-e a malacokra, mint ahogy az korábban már újszülött patkányokban és tengerimalacokban bizonyítást nyert.

Az agykérgi mikrovaskuláris válasz NMDA stimulációt követően

A gradált hiperkapniára kialakuló agykérgi mikrovaskuláris válasz széles körben tanulmányozott malac modellekben, azonban csak néhány kísérleti eredmény áll rendelkezésre a piális arteriola átmérő és a CoBF szimultán változásáról. Az NMDA indukálta piális arteriola dilatációt először újszülött malacban írták le, ami később további fajokban is megerősítést nyert. Számos állatmodellben bizonyított, hogy az NMDA-indukálta piális arteriola dilatációt a neuronális NO mediálja. Kutatásaink során az nNOS inhibíció következtében hasonló mértékű piális arteriola dilatáció attenuációja (~30-40%) volt megfigyelhető NMDA stimulációt követően, mint a korábbi nNOS-gátló 7-nitroindazole-lal végzett kutatások esetében. Ezzel szemben vizsgálataink eredményeképpen az NMDA-ra adott arteriola vazodilatáció csökkenése nem okozott véráramlás válaszbeli gátlást a parenchimában, ami így közel változatlan maradt. Eredményeink azt feltételezik, hogy az intraparenchimális arteriolák dilatációja döntő szereppel bír a CoBF válasz meghatározásában, valamint kompenzálni képes a kisebb piális arteriolák dilatációját NMDA jelenlétében, ha az nNOS aktivitás gátolt. Más vazodilatációs mechanizmusok túlnyomórészt az intraparenchimális erekre gyakorolhatnak hatást és fontos szerepet tölthetnek be az NMDA-ra adott CoBF válasz mediálásában, mely jövőbeli kutatásaink egyik fő célpontja lehet.

A piális arteriolák gradált hiperkapniára adott válasza igen érzékeny a HI stresszre, endothél sérülésre és görcsökre egyaránt, melyek jó markerei a neurovaszkuláris egység diszfunkciójának felderítésére. Az SD-k is jól ismert gátolják a hiperkapnia mikrovaszkuláris válaszait a felnőtt agyban. Jelen tanulmányban az NMDA attenuálta a gradált hiperkapniára adott választ az újszülött agykéregben, HI stressz jelenléte nélkül is, amely nagymértékű hasonlóságot mutat a felnőtt agykéregben megjelenő SD-k hatásával. A malac agykéregben SD-ket nem lehet kiváltani, ezért feltételezzük, hogy a kérgi depolarizáció nem játszik központi szerepet az attenuáció mechanizmusában, mivel a KCl-al kiváltott kérgi depolarizációnak nincs hatása a hiperkapnia vagy más stimulus következtében létrejövő mikrovaszkuláris válaszra. Jelen tanulmányunk alapján azt feltételezhetjük, hogy az NMDA-indukált mikrovaszkuláris reaktivitás megváltozása nNOS aktivitáshoz köthető, de mégis függetlennek bizonyulnak az NMDAR aktiváció direkt hemodinamikai hatásaitól. Egyelőre nem tudjuk bizonyítani, hogy az NMDAR aktiváció a kulcsa az SD-t követő neurovaszkuláris diszfunkciónak (mivel az SD-k tanulmányozása nem lehetséges az újszülöttekben), azonban eredményeink mindenképpen felvetik ezt az érdekes lehetőséget.

Az agykérgi neuronális válasz NMDA stimulációt követően

Tanulmányunkban megkezdjük a már jól ismert hiperkapnia és NMDA cerebrovaszkuláris hatásainak és a kevésbé kutatott neuronális hatások kapcsolatának feltérképezését az agykéregben. Jelen tanulmány az első, amely gradált hiperkapnia és NMDA stimulációt követően vizsgálta az agykéreg elektrofiziológiai tulajdonságait. Eredményeink jól mutatják, hogy a hiperkapniának réteg-specifikus és koncentráció-függő hatása van mind az LFP-re, mind pedig a sejtaktivásra nézve. Eredményeink szintén bizonyítják, hogy az agykéregnek nem csak a szuperficiális, de a mélyebb rétegei is érintettek az agyfelszínre juttatott NMDA stimuláció hatásának közvetítésében. Az NMDA 2.5 Hz-es erőteljes delta-oszcillációt váltott ki, mely az agykéreg felszíne alatt 600-800 μm -rel volt a legkifejezettebb, szuppresszálja a PSD-t minden más frekvencia tartományban. Az NMDA ellentmondásos hatást gyakorolt a neuronok tüzelésére is, különböző populációinak tüzelését stimulálva vagy gátolva. NMDA stimulációt követően a PSD visszatért a kiindulási szintre, valamint abnormális sejtaktivitások sem voltak megfigyelhetők az NMDA alkalmazása alatt/után, mely azt feltételezi, hogy az agykéreg nem érte szignifikáns excitotoxikus stressz az NMDA stimuláció során. Ez a megállapítás összhangban van a korábbi

tanulmányokkal, melyekben a neurovaszkuláris válasz prezervált maradt ismételt NMDA stimulációt követően (akár 4 ismételt alkalmazás egy 5 órás perióduson belül).

Kutatásaink bizonyítják, hogy a gradált hiperkapnia elektrofiziológiai válasza NMDA stimulációt követően jelentős mértékben megváltozik. Ok-okozati összefüggést nem tudunk egyelőre levonni, hogy a neuronális válasz megváltozása triggereli-e a mikrovaszkuláris reaktivitás megváltozását, vagy *vice versa*, azonban eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az NMDA-indukált mikrovaszkuláris válasz attenuációjának mechanizmusában nem kizárólag az agyi érhalózat játszik szerepet. Azonban feltételezhetjük, hogy az NMDA stimulációt követő elektrofiziológiai válaszok néhány aspektusa részt vehet a hiperkapnia mikrovaszkuláris reaktivitásának attenuációjában és a kialakuló CoBF válaszban. További kísérletek szükségesek, hogy azonosítani tudjuk a topikálisan alkalmazott NMDA specifikus és szelektív szerepét a neuronális-vaszkuláris mechanizmusokban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Jancsó Gábor Professor Úrnak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola korábbi vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a posztgraduális képzésbe való belépésemre. Köszönettel tartozom Dr. Bari Ferenc Professor Úrnak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy biztosította a PhD tanulmányaim befejezésének körülményeit. Köszönettel tartozom Dr. Sály Gyula Professor Úrnak, az Élettani Intézet vezetőjének, aki a munkámat lehetővé tette és támogatta. Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Domoki Ferencnek, aki lehetőséget biztosított, hogy laboratóriumában dolgozhassak, elsajátíthassam a műtéti eljárásokat, az orvos szemléletű tudást, valamint segítséget nyújtott az angol készségeim fejlesztésében. Köszönettel tartozom minden mostani és korábbi munkatársamnak, Dr. Kovács Viktóriának, Dr. Németh Jánosnak, Dr. Varga Viktóriának és Tóth-Szűki Valériának, hogy mindig tanácsokkal láttak el és segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzésében. Köszönettel tartozom az Élettani Intézet minden munkatársának a motiváló és segítő légkörért. Köszönettel tartozom családomnak a támogatásukért és szeretetükért. Külön köszönöm édesanyámnak, Vass Évának, aki mindig mellettem áll, bármerre is sodorjon az élet, valamint édesapámnak, Remzsó Attilának, aki mindig a precíz és kemény munkára inspirált. Nélkülük nem valósíthattam volna meg céljaimat az életben. Köszönettel tartozom barátaimnak, Molnár Zoltánnak, Sulumán Ádámnak, Puskás Tamásnak, Somodi Henriknek és Dr. Kelemen Fanninak, hogy mindig mellettem álltak, amikor szükségem volt rájuk.

TÁMOGATÓK

Köszönettel tartozunk az alább felsorolt pályázatoknak kutatásaink finanszírozásáért:

- EU-finanszírozott GINOP (GINOP 2.3.2 15 2016 00034) pályázat
- EU-finanszírozott EFOP (EFOP-3.6.1-16-2016-00008) pályázat
- Nemzeti Agykutatási Program 2.0 (2017-2.1 NKP 2017 00002)

A TÉZIS ALAPJÁT KÉPEZŐ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK:

Brain interstitial pH changes in the subacute phase of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn pigs.

Gábor Remzső, János Németh, Viktória Varga, Viktória Kovács, Valéria Tóth-Szúki, Kai Kaila, Juha Voipio, Ferenc Domoki.

PlosOne. 2020; 15(5): e0233851. DOI: 10.1371/journal.pone.0233851. IF: 2.74.

NMDA attenuates the neurovascular response to hypercapnia in the neonatal cerebral cortex.

Gábor Remzső, János Németh, Valéria Tóth-Szúki, Viktória Varga, Viktória Kovács, Ferenc Domoki.

Scientific Reports 2019; 9(1):18900. DOI: 10.1038/s41598-019-55468-1. IF: 3.998.

TOVÁBBI TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK:

Inhaled H₂ or CO₂ do not augment the neuroprotective effect of therapeutic hypothermia in a severe neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy piglet model.

Viktória Kovács, **Gábor Remzső**, Valéria Tóth-Szúki, Viktória Varga, János Németh, Ferenc Domoki.

Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(18), 6801. DOI: 10.3390/ijms21186801. IF: 4.556.

Asphyxia-induced neuronal cyclooxygenase-2 expression is alleviated by molecular hydrogen in newborn pigs.

Viktória Varga, János Németh, Orsolya Oláh, Valéria Tóth-Szúki, Viktória Kovács, **Gábor Remzső**, Ferenc Domoki.

Acta Pharmacologica Sinica. 2018; 39: 1273–1283. DOI: 10.1038/aps.2017.148. IF: 5.064.

Active forms of Akt and ERK are dominant in the cerebral cortex of newborn pigs that are unaffected by asphyxia.

Viktória Kovács, Valéria Tóth-Szúki, János Németh, Viktória Varga, **Gábor Remzső**, Ferenc Domoki.

Life Sciences. 2018; 192:1-8. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.11.015. IF: 3.647.

Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy.

János Németh, Valéria Tóth-Szűki, Viktória Varga, Viktória Kovács, **Gábor Remzsó**, Ferenc Domoki.

J Physiol Pharmacol. 2016; 67(5):677-689. PMID: 28011948. IF: 2.644.

Kumulatív impakt faktor: 22.649