

Az öregedés hatása a terjedő depolarizációval járó érválaszokra és a kérgi perfúziós változásokra

Ph.D. Tézis

Puskás Tamás



Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Szeged, 2020

Bevezetés

A terjedő depolarizáció (spreading depolarization – SD) jelenségét 1944-ben Leão írta le először, az SD sejtszintű mechanizmusai és az SD hatásai azonban a mai napig intenzív kutatás fókuszába esnek. Az SD szerepe alapvető fontosságú különböző neurovaszkuláris betegségek, mint az aurás migrén, a zárt koponyasérülés, és az iszkémiás vagy vérzéses stroke kórélettanában. Az SD egy adott térfogatú agyszövetben a neuronok nyugalmi membránpotenciáljának szinte teljes megszűnése, mely lassan, 2-8 mm/perc sebességgel terjed a szürkeállományban. Ez az elektrokortikális aktivitás jelentős, átmeneti mérséklődésével jár, melyet terjedő depresszióknak nevezünk. A membránpotenciál helyreállításához ATP-függő csatornák (mint a Na⁺/K⁺ ATP-áz) aktivitása szükséges, melyek működéséhez az anyagcsereforrások mobilizációja elengedhetetlen. E szükséglet okán, az egészséges szövetben egy hiperémiás vérátáramlási válasz (cerebral blood flow – CBF) kapcsolódik az SD-hez. Ez a kapcsolat iszkémiás állapotban sérül, így egy metabolikus kínálati és keresleti eltérés, illetve az ebből következő energiaválság adódik a fennálló oxigénhiányhoz és szöveti sérüléshez.

Az SD-hez társuló CBF válasznak négy jellegzetes fázisa van: először egy rövid kezdeti hipoperfúzió, másodsor egy jellegzetes átmeneti hiperémiás csúcs, harmadikként egy kevésbé kifejezett késői hiperémia, majd végül egy fennmaradó hipoperfúzió (SD-t követő

oligémia) következik. Ép keringésű agykéregben a fiatal agyban a hiperémiás komponens a legkifejezettebb, azonban ez kisebb amplitúdójúvá, jelentéktelenebbé válik iszkémia során, ahol a hipoperfúzió válik dominánssá. Az SD-vel együtt tovaterjedő hemodinamikai válasz a piális és penetráló arteriolák szintjén szembetűnő.

Az öregedéssel az iszkémiás kérgi területeken áthaladó SD-k fokozódó kihívást jelentenek a neuronokra nézve. A repolarizáció késhet az idős agyban, mert a visszatérés az SD-vel járó acidózisból az életkor előrehaladtával egyre késleltettebb, valamint a hiperémia elégtelenné válik, illetve gyakran terjedő iszkémia veszi át a helyét. Mindezek együttléve jelezhetik és hozzájárulhatnak az iszkémiás penumbra átalakulásához irreverzibilisen sérült core régióvá. A hiperémiás válasz öregedés miatti mérséklődésének ellenére sem állapítható meg, hogy a kapcsolódó depolarizáció is arányosan csökkenne. Ez megalapozza a feltételezést, hogy az öregedés gyengíti az SD, és a vele járó hiperémia közötti kapcsolatot.

Az SD jelenségének regisztrálására hagyományosan mikroelektrodákat alkalmaznak. Ezek mellett az ionmozgások és a szövet metabolikus változásai ionszenzitív elektródákkal is vizsgálhatók. Noha e technikák kiváló időbeli felbontással teszik lehetővé e jelek regisztrálását, az SD térbeli fejlődésének és

anyagcsere hatásainak vizsgálata nagy térbeli felbontású, képalkotó eljárásokkal válik lehetségessé.

Az SD-hez kapcsolt CBF válaszok vizsgálatához kifejlesztettünk egy kísérleti multimodális nagy látóterű optikai képalkotó rendszert, amely megfelelő tér- és időbeli felbontással teszi lehetővé az SD tanulmányozását. Két szinkron modalitás kombinációja – lézeres szórás interferencia kontrasztelemezés (LASCA – Laser Speckle Contrast Analysis) és „Intrinsic Optical Signal” (IOS) zöld fény megvilágításnál – egyedülálló lehetőséget nyújt a CBF változások és a piális arteriolák átmérőváltozásainak, illetve architektúrájának egyidejű vizsgálatára. Továbbá lehetővé tettük mintáinkban a szöveti pH monitorozását a vitális, intracelluláris pH-t (pHi) indikáló Neutral Red (NR) festék alkalmazásával. Az NR képalkotással az SD-vel járó pHi változásokat vizsgáltuk, valamint a LASCA-val kombinálva a CBF és pH változások összefüggéseit monitoroztuk.

Vizsgálatunk fő kérdése a fentiek alapján, hogy miként befolyásolja az öregedés vagy iszkémia az SD, CBF és szöveti acidózis összefüggéseit.

Kutatási céljaink:

- Megállapítani, hogy az öregedés hatására az SD-re adott piális arterioláris válasz károsodik-e.

- Meghatározni, hogy a piális érzékenység és nyugalmi értékmérő változik-e az öregedéssel.
- Megvizsgálni az SD-k során, hogy az áramlás térbeli eloszlása megváltozik-e az öregedés hatására.
- Összefüggéseket keresni az SD tipikus DC potenciál válasza, a vele járó pH változások és a CBF válaszok hiperémiás komponensének kinetikája között.

Anyagok és módszerek

Kísérleti projekt 1: A képzőanyagot kísérletekhez fiatal (n=20, 2 hónapos) és idős (n=18, 18-20 hónapos), hím, izoflurán altatott, spontán lélegző, Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Egy nyaki bemetszést követően szilikon burkolatú horgász zsinórt vezetünk mindkét nyaki artéria köré, melyek a későbbi akut globális előagyú iszkémia kiváltását biztosították (2VO, 2-vessel occlusion). A parietális kortex fölé egy zárt koponyaablakot alakítottunk ki. A műtéti beavatkozásokat követően három kísérleti fázisban gyűjtöttünk adatokat: Az alapvonal szakaszában (50 perc), ahol az agyi perfúzió intakt volt. Ezt követően a 2VO-val kiváltott, akut globális előagyú iszkémia szakaszában (1 óra). Végül a reperfúziós szakaszban (1 óra), mely a nyaki artériák felengedésével kezdődött. A kísérlet minden fázisában 3 SD-t váltottunk ki (1 μ l, 1M KCl), 15 perces különbséggel. A lokális jelintenzitás (IOS, LASCA) változásokról, érmentes parenchimális területre helyezett 70x70 μ m-es érdeklődési területből,

(region of interest, ROI) idősorok formájában nyertünk információt. A vaszkuláris denzitást és a piális arteriolák átmérőváltozásait tartalmazó idősort az IOS képek segítségével számoltuk ki. A CBF térképeket egy összetettebb analízisben, a perfúzió térbeli eloszlásának változásainak megismeréséhez is alkalmaztuk.

Kísérleti projekt 2: A fenti kísérleti protokollal további állatokon (n=17) elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk. Ez esetben a parietális csonton két koponyaablakot nyitottunk. A kaudális helyzetű, az SD-k kiváltását biztosította, 1M KCl oldat topikális alkalmazásával. A rostrális ablakban lézer doppler szenzort, pH-szenzitív mikroelektrodát és egy referencia DC potenciál elektrodát helyeztünk el. Az SD-re jellemző negatív DC potenciál változás, a kapcsolódó acidózis és a CBF válasz hiperémiás komponensének időtartamát és relatív amplitúdóját mértük.

Eredmények

Kísérleti projekt 1

Vaszkuláris architektúra: Fiatal és idős állatokban egyformán, nagyjából a kortikális felszín felét piális erek fedték le.

A piális arterioláris átmérő és a CBF változásai - a felvételek esemény mentes szakaszai: A nyugalmi piális arterioláris átmérőt az első SD-t megelőzően mértük. Az érátmérő magától értetődően az elágazási szintek szerint szignifikánsan csökkent (83 ± 16 , 51 ± 18 és 31 ± 9 μm , 1.,

2. és 3. rendű erek a fiatal csoportban (*F=20,951, $p<0.0001$) és hasonló volt a két korcsoportban. Az iszkémia létrehozása a fiatal csoportban egy azonnali átmérő csökkenést okozott az 1. és 2. rendű arteriolákban (89 ± 12 and 93 ± 15 %-ra), míg a 3. rendű arteriolák átmérője nem változott (101 ± 16 %). Később az utóbbiak átmérője az alapszint fölé emelkedett (107 ± 15 and 112 ± 19 %, 10 perccel az iszkémiás szakasz kezdete után és röviddel a reperfúzió megkezdése előtt). A reperfúziós szakasz folyamán az átmérők a piális arterioláris fa mindhárom szintjén az alapvonal fölé emelkedtek (111 ± 8 , 106 ± 9 és 113 ± 9 %, 1., 2. és 3. rendű erek). Idős állatokban az 1. és 2. rendű arteriolák válasza hasonló volt a fiatalokban tapasztaltakhoz. Ezzel szemben a 3. rendű arteriolák kevésbé voltak képesek dilatációra az iszkémiás szakaszban.

A lokális CBF változásokat az SD kiváltás helyétől a lehető legtávolabb elhelyezett ROI-ban mértük. A nyaki artériák elzárása egy hirtelen CBF csökkenést okozott (az alapvonal 16 ± 8 és 15 ± 9 %-ára, fiatal és idős). Ezt követően az áramlási eloszlást meghatározott mintavételi időkből számítottuk ki. Az alap szakaszban az áramlási szintek normális eloszlást mutattak. Az iszkémiás szakasz kezdete után az áramlási eloszlásban az alacsony perfúziós szintek váltak dominánssá. Végül a reperfúzió eredményezte a legszélesebb megoszlást az áramlási szintekben és a legszembetűnőbb különbséget a CBF térbeli mintázatában a fiatal és idős csoportok között. A fiatal

állatokban a terület közel fele a 31-70 %-os CBF tartományba esett, amin belül a legjellemzőbb tartomány a 41-50 % volt (13 ± 11 %-a, a teljes területnek). Ezzel szemben az idős állatokban a kortikális felszínnek nagyjából a fele esett a 71-110%-os CBF tartományba, és a 91-110%-os tartomány tette ki a legnagyobb területet (13 ± 6 %-át a teljes területnek).

A piális arterioláris átmérő és a CBF változásai - SD-re adott válasz:
Mivel az SD-re adott érátmérő változások csak az alap szakaszban voltak reprodukálhatók, a részletes analízis erre az első szakaszra korlátozódott. Az első SD-hez egy erőteljes, átmeneti vazodilatáció (124 ± 15 , 125 ± 26 és 122 ± 18 %, 1., 2. és 3. rendű arteriolák fiatal állatban) és egy azt követő vazokonstriktió társult (93 ± 6 , 94 ± 5 és 95 ± 3 %, 1., 2. és 3. rendű arteriolák fiatal állatban), összhangban a vazodilatációval egyidejű jelentős tranzienst hiperémiával (209 ± 30 % CBF fiatal állatban) és az azt követő oligémiával (65 ± 22 % fiatal állatban). A további SD-k (kiváltásukkor az első SD okozta oligémia még fennállt) hasonlóképpen a piális arterioláris átmérő növekedésével (123 ± 11 , 125 ± 23 és 129 ± 27 %, 1., 2. és 3. rendű arteriolák fiatal állatban) és jelentős hiperémiával jártak (198 ± 44 % CBF fiatal állatban). Az öregedés erőteljes hatást gyakorolt az SD-hez kapcsolódó cerebrovaszkuláris reaktivitásra. A piális arterioláris dilatáció kevésbé volt meghatározó az első SD-t követően (1., 2. és 3. rendű arteriolák: 114 ± 10 vs. 124 ± 15 , 107 ± 9 vs. 125 ± 26 és 109 ± 9 vs.

122±18 %, idős vs. fiatal) és a további SD-knél egyaránt (1., 2. és 3. rendű arteriolák: 113±7 vs. 123±11, 109±9 vs. 125±23 and 111±6 vs. 129±27 %, idős vs. fiatal). Ennek megfelelően az SD-re adott hiperémiás válasz csúcsértéke alacsonyabb volt (első SD: 174±33 vs. 203±33 %, öreg vs. fiatal; további SD-k: 182±57 vs. 198±44 %, idős vs. fiatal). Míg a perfúziós szintek analízise csak trendeket mutatott (a legjellemzőbb perfúziós szintek az ismételt SD-kre fiatal állatokban 141-160 %, idősökben 121-140% volt), a hisztogramok sokkal árnyaltabb információt nyújtottak. A hisztogram csúcs szignifikánsan alacsonyabb CBF értékre esett idős állatokban a fiatalokhoz képest (137±35 vs. 167±28 %, idős vs. fiatal), egy alacsony perfúziós szintek irányába történő eltolódást jelezve.

Kísérleti projekt 2

Az SD-vel járó DC potenciál változás amplitúdója 0,99 és 19,44 mV intervallumra esett. Az SD metabolikus következményeinek vizsgálatára a DC potenciál változás, a hozzá társuló acidózis és hiperémia amplitúdói és időtartamai közti összefüggést részleteiben vizsgáltuk. Az alapszakaszban, fiatal állatokban, mindhárom változó amplitúdója erősen korrelált (DC potenciál változás és hiperémia: $r = 0,819$, $*p < 0,05$), míg az időtartamuk egymástól független volt (DC potenciál változás és hiperémia: $r = 0,176$).

Az iszkémiás szakaszban a hiperémia amplitúdója nem követte a DC potenciál, és az acidózis amplitúdóját ($r = 0,236$ and $r = 0,429$) és a reperfúzió során is független maradt. A három változó alapszakaszban független időtartamai az iszkémiás fázisban kapcsolttá váltak (DC potenciál változás és acidózis: $r = 0,935$, $**p < 0,01$), majd a reperfúziós szakaszban a korreláció megszűnt. Az idős kor hatására megszűnt a korreláció a hiperémia amplitúdója és a DC potenciálváltozás, valamint az acidózis között is ($r = 0,221$ és $r = 0,249$), míg a DC potenciál változás és hiperémia időtartamának kapcsolata nem változott ($r = 0,657$, $*p < 0,05$). Az acidózis időtartama viszonylag rövidnek mutatkozott a hiperémiáéhoz képest fiatal állatokban, azonban idősekben azt meghaladta. Végül megjegyzendő, hogy a hiperémia relatív időtartama (az adott szakasz DC potenciálváltozásának hosszához viszonyítva) fokozatosan csökkent (195%, 172%, 167%; fiatal alapvonal, fiatal iszkémia, idős iszkémia), míg az acidózis relatív időtartama növekedett az iszkémia és életkor hatására (127%, 140%, 192%, fiatal alapvonal, fiatal iszkémia, idős iszkémia).

Ha az alap szakaszban kiváltott SD-eket a DC potenciál változás amplitúdója szerint kategorizáljuk ($<5\text{mV}$ és $>5\text{mV}$), a szöveti pH szignifikánsan savasabbnak bizonyult a kis DC potenciál amplitúdójú SD-eket megelőzően (pH $7,20 \pm 0,04$ vs. $7,31 \pm 0,03$). Ezt tovább erősíti, hogy egy erős pozitív korrelációt találtunk az SD-t megelőző

szöveti pH és az SD-vel járó DC potenciálváltozás amplitúdója között ($r = 0,909$, $**p < 0,01$), ami az iszkémia hatására megszűnt ($r = 0,244$), majd a reperfüzió során ismét rendeződött ($r = 0,739$, $*p < 0,05$).

Konklúzió

Az akut iszkémiás stroke incidenciája az 50 év feletti korcsoportban 5 évente duplázódik, valamint az iszkémiás penumbra infarktusos területté alakulása is felgyorsul az életkor előrehaladtával. Összefoglalva, az iszkémiás stroke exponenciálisan gyakrabban fordul elő a korosodó populációban és ezzel együtt a neurológiai következményei is súlyosbodnak. A fenti körülmények erősen indokolják az életkor hatásainak kutatását az iszkémiás stroke kórélettanában, hogy megérthessük a fontos, korból adódó, maladaptív változásokat az ideg- és cerebrovaszkuláris rendszerben, melyek a stroke kockázatát növelik és kedvezőtlenebb kimenetelhez vezetnek az idős páciensekben. Jelen tanulmányunkban az életkor hatását vizsgáltuk az SD-vel kapcsolatos cerebrovaszkuláris és metabolikus változásokra, mivel az SD-t az akut agysérülés léziójának terjedésében elsődleges mechanizmusaként tartják számon. Munkánkban a következő eredményekre jutottunk:

- (i) A piális és kortikális penetráló cerebrovaszkuláris rendszer denzitása és nyugalmi tónusa a kor hatására nem változott. Ezzel szemben a piális arteriolák SD-re mutatott dilatációs

képessége gyengébbnek bizonyult a fiatal állatokban tapasztaltakhoz képest, ami a neurovaszkuláris csatolás korfüggő károsodására utal.

- (ii) Kísérleteinkben felismerünk egy életkorfüggő változást a kéri perfúzióeloszlásban: a magas perfúziós szintek jobban reprezentáltak a reperfúziót követően a kortextben. Ez súlyosabb iszkémia/reperfúziós sérülés kockázatát hordozza az idős agyban, a sokkal jelentősebb oxidatív stressz okán.
- (iii) Végül megállapítottuk, hogy az öregedés aránytalanul növeli az SD-vel járó szöveti acidózis hosszát. Ennek jelentőségét fontos kiemelni, mivel a savas környezetnek való kitettség meghosszabbodása csökkenti az acidózis indukálta sejthalál küszöbét, ami így az idős agyban sokkal jelentősebb lehet.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a cerebrovaszkuláris rendszer életkorfüggő károsodásai és az SD-vel járó fokozott metabolikus teher hozzájárulhat az iszkémiás stroke súlyosabb kimeneteléhez idős páciensekben.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék mindenkinek köszönetet nyilvánítani, aki részt vett eredményeim létrehozásában! Elsőként Dr. Bari Ferenc Professor Úrnak, az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet korábbi vezetőjének, hogy támogatta a kutatócsoportba való csatlakozásomat. Hálás vagyok témavezetőmnek Dr. Farkas Eszternek, tanácsaiért, építő kritikájáért és türelméért. Köszönettel tartozom Dr. Jancsó Gábor Professor Úrnak, aki lehetőséget adott az Idegtudományi Doktori Programban való részvételre. Köszönöm munkatársaimnak a motiváló és segítőkész légkört: Dr. Zölei-Szénási Dánielnek, Dr. Makra Péternek, Dr. Menyhárt Ákosnak, Dr. Varga Dánielnek és Ivánkovitsné Kiss Orsolyának. Külön köszönet illeti korábbi TDK hallgatómat Bálint Armand Rafaelt igyekvő munkájáért és állandó érdeklődéséért, és Rárosi Ferencet matematikai tanácsaiért és barátságáért.

A tézis alapját képző tudományos közlemények:

I. Ákos Menyhárt, Dániel Zölei-Szenási, **Tamás Puskás**, Péter Makra, Ferenc Bari, Eszter Farkas

Are or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarisation in the rat brain

American journal of physiology: heart and circulatory physiology 313: (2) pp. H328-H337. (2017)

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00222.2017> **IF: 3.348**

II. Armand R. Bálint*, **Tamás Puskás***, Ákos Menyhárt, Gábor Kozák, Imre Szent, Zoltán Kónya, Tamás Marek, Ferenc Bari, Eszter Farkas

* These Authors contributed equally to the work.

Aging impairs cerebrovascular reactivity at preserved resting cerebral arteriolar tone and vascular density in the laboratory rat
Frontiers in aging neuroscience 11 Paper: 301, 12 p. (2019)

<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00301> **IF: 4.362**

További tudományos közlemények:

1. Varga, DP*; Puskas, T*; Menyhart, A; Hertelendy, P; Zolei-Szenasi, D; Toth, R; Ivankovits-Kiss, O; Bari, F; Farkas, E

* These Authors contributed equally to the work.

Contribution of prostanoid signaling to the evolution of spreading depolarization and the associated cerebral blood flow response.

Scientific Reports 6 Paper: 31402 , 11 p. (2016) **IF: 5.228**

2. Menyhart, A ; Zolei-Szenasi, D ; **Puskas, T** ; Makra, P ; M., Toth O ; Szepes, BE ; Toth, R ; Ivankovits-Kiss, O ; Obrenovitch, TP ; Bari, F et al.

Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced

tissue acidosis in the young and aged rat brain

Scientific Reports 7: 1 Paper: 1154 , 13 p. (2017) **IF: 4.259**

3. Varga, DP ; Menyhart, A ; Puskas, T ; Bari, F ; Farkas, E ; Kis, Z ; Vecsei, L ; Toldi, J ; Gellert, L

Systemic administration of L-kynurenine sulfate induces cerebral hypoperfusion transients in adult C57Bl/6 mice

Microvascular Research 114 pp. 19-25. , 7 p. (2017) **IF: 2.371**

A tézis alapját képző tudományos közlemények impact faktora: 7,71

Az összes tudományos közlemény impact faktora: 19,568