

**AZ ISZKÉMIÁS AGYKÉRGI KÚSZÓ DEPOLARIZÁCIÓVAL JÁRÓ  
VÉRÁTÁRAMLÁSI VÁLASZOK JELLEMZÉSE  
KÍSÉRLETES AGYI KÉPALKOTÁSSAL**

**Dr. Bere Zsófia**

PhD Tézis

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Fizikai  
és Orvosi Informatikai Intézet

PhD Program:

Elméleti orvostudományok

Program vezető: Prof. Jancsó Gábor D.Sc.

Témavezető: Farkas Eszter PhD

Szeged, 2017



## 1. Bevezetés

A stroke mind Magyarországon, mind Európában a vezető halálozási okok egyike, a kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedések mellett. Az akut fázisban bekövetkező károsodás mértéke jelentősen függ a primér sérülés jellegétől, a szövet túlélése szempontjából a mielőbbi orvosi beavatkozás elengedhetetlen, de a későbbi időszak patofiziológiai folyamatai következtében megjelenő szekunder progresszió megismerése, és annak megelőzése szintén nélkülözhetetlen a sikeres kezelési stratégia kialakításához. Ilyen szekunder jelenség az iszkémia során megjelenő agykérgi kúszó depolarizáció (spreading depolarization-SD), mely tovább rontja a szövet túlélési esélyeit. Ennek tükrében az SD kutatása- tekintettel az iszkémiás károsodás progressziójában játszott szerepére- jelentősen felgyorsult az elmúlt évtizedekben.

A kezdetben a csupán kísérletesen előidézhetőnek tartott jelenségre először A.P. Leao brazil neurofiziológus figyelt fel. 1944-ben publikált cikkében altatott nyulakon végzett kísérleteinek eredménye szerint az agykéreg egy pontjának elektromos ingerlés hatására távolabbi agyterületekről elvezetett eletrokortikogrammon (ECoG) a spontán kérgi elektromos aktivitás átmeneti megszűnése figyelhető meg, melyet az ECoG jel amplitúdójának beszűkülése jelöl. Ez a tranziens ECoG depresszióként is leírt jelenség mindig a kiváltáshoz legközelebbi elvezetési ponton jelent meg, és fokozatos terjedést mutatott a távolabbi elektródák felé. Ezért nevezte el a jelenséget Leao „spreading depression of cortical activity”-nek, azaz a kérgi aktivitás kúszó depressziójának. További vizsgálatok igazolták, hogy az agyi membránpotenciál-változásokat mutató, ún. DC regisztrátumon az ECoG depressziójával szimultán jelentős kérgi neuron populáció depolarizációja alakul ki, mely jellemzően a kérgi ion homeosztázis jelentős felborulásával jár; az idegsejtek membránja extrém mértékben permeábilissá válik ozmotikusan aktív kationokra (pl.  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$ ), melynek következtében a sejtek megduzzadnak, ún. neurotoxikus ödéma alakul ki. A tartós membrán depolarizáció következtében az akciós potenciál kialakulásában szerepet játszó ioncsatornák inaktiválódnak, így a sejtek átmenetileg ingerelhetetlenné válnak.

Tekintettel arra, hogy a membránpotenciál helyreállítása ATP függő folyamat, a megnövekedett metabolikus igény megköveteli a szövet gyors oxigén és glükóz ellátását, mely az ún. neurovaszkuláris csatolás feladata. A neurovaszkuláris csatolás egy olyan szabályzórendszer, mely a lokális agyi vérátáramlást a megnövekedett neuronális aktivitáshoz, és ennek következtében megnőtt metabolikus igényhez igazítja. A

következményes funkcionális hiperémia megnöveli a szövet oxigén és tápanyag ellátását, biztosítja az anyagcsere termékek elszállítását, fenntartva a szövet számára ideális homeosztatikusságot és lokális mikrokozmoszt.

Az SD-k tipikus lokális agyi vérátáramlás változással járnak; a fiziológiai áramlási transziens négy komponensből tevődik össze: (i) kezdeti átmeneti enyhe áramlás csökkenést (ii) kifejezett hiperémiás csúcs és (iii) egy kevésbé markáns késői hiperémia, illetve (iv) elhúzódó hipoperfúzió követ, melyet kúszó oligémia, vagy poszt-depolarizációs oligémiaként is jelölnek. A végső, oligémiás szakasz a csúcshiperémiát követően kb 30-60 percig elhúzódik.

A Leao által felfedezett agykérgi kúszó depolarizációk patofiziológiai szerepe ma már stroke, szubarachnoidális vérzés, valamint zárt kopnyasérülés esetében klinikailag is igazolt. Megjelenése potenciálisan az iszkémiás károsodás progresszióját vonja maga után; bizonyítottan hozzájárul az egyébként életképes, de elektrofiziológiailag inaktív penumbra területek irreverzibilis károsodásához, így az infarktus méretének növekedéséhez. Kísérletes munkák alátámasztják a megjelent depolarizációk száma illetve kumulatív ideje, valamint az infarktus mérete közti egyenes arányú összefüggést is.

Az iszkémia során megjelenő SD-k hossza nagymértékben függ a szövet metabolikus státuszától. Ismeretes, hogy depolarizációt követően a transzmembrán potenciál helyreállítása energiaigényes, ATP függő folyamat. Amennyiben az oxigén-tápanyag kínálat kielégítő, a depolarizáció rövid, transziens, és a repolarizáció rövid időn belül (egy percen belül) lezajlik. Azonban ha a perfúziós deficit miatt a kínálat nem képes fedezni a szövet megnövekedett tápanyagigényét, a depolarizáció megnyúlik, mellyel egy időben a kérgi aktivitás reverzibilis depressziója észlelhető- típusosan pl. a penumbra területén. Jelentős oxigén és tápanyaghiány esetén a repolarizáció elmarad, és létrejön az ún. terminális depolarizáció, mely az iszkémiás magra jellemző. Ezek alapján, amíg a szövet képes repolarizációra, a károsodás reverzibilisnek tekinthető, míg a terminális depolarizáció megjelenése az irreverzibilis károsodás jele. Összességében, a depolarizáció hossza a metabolikus krízis jellemzője, és az iszkémiás károsodás kimenetelének prognosztikus faktora.

Az SD-k károsító hatásának hátterében álló mehanizmusok máig vizsgálatok tárgyát képezik. Jelen állás szerint neurovaszkuláris csatolás károsodása neurodegenerációhoz vezet. Jelentős agyi iszkémia esetén ugyanis a fiziológiai, hiperémiával járó áramlásválasz a vazokonstriktor mechanizmusok túlsúlya miatt elmarad, vagy jelentős hipoperfúziós válasz jön létre, mely a depolarizációval együtt tovaterjed a szövetben. Ennek hatására a

repolarizáció késik, a mélyülő energiadeficit miatt az ionegyensúly és lokális metabolikus státusz felborul, mely további depolarizációs hullámok kialakulásának kedvez. Összességében, az elhúzódó depolarizáció a következményesen kialakuló kúszó iszkémiával növeli a nekrotikus terület méretét, és így az irreverzibilisen károsodott szövetrész nagyságát.

Az SD-k vizsgálatára eddig alkalmazott elektrofiziológiai módszerek, mint például az EEG, illetve a DC potenciál mérés csupán pontszerű leképezést tettek lehetővé, ily módon nem szolgáltatott információt a hullámok pontos tér- és időbeli terjedéséről, valamint a csatolt hemodinamikai változásokról. Kutatócsoportunk olyan multimodális képalkotó eljárást dolgozott ki, mely alkalmas a kérgi depolarizációs események és szinkron bekövetkező hemodinamikai változások szimultán, két dimenzióban történő nyomon követésére. A módszer egy a szövetbe juttatott festék fluoreszcencia-intenzitásának, és a szövetről visszaverődő fény intenzitásának változásain alapul, melyeket érzékeny, nagy felbontású kamerák segítségével detektálunk. A kérgi membránpotenciál változás vizsgálatának elve egy feszültségfüggő festék fluoreszcenciaintenzitás-változásának követése, melynek jelintenzitása a csökkenő membránpotenciállal (depolarizációval) növekszik. Az agyi térfogat és hemoglobin (Hb) szaturáció változásához a szövetről visszaverődő, adott hullámhosszú fény intenzitásának változásait (intrinsic optical signal- IOS) használtuk fel. A reflektancia változás zöld fény esetén a vértérfogat, míg piros fény esetén a deoxi-oxi Hb arány alakulására (szaturáció-deszaturáció) utal. (Vértérfogat növekedés esetén több zöld fény abszorbeálódik, így a reflektancia csökken, míg szaturáció növekedés esetén a piros fény reflektanciája nő). Mindezek mellett az agyi véráramlást (cerebral blood flow-CBF) lézer folt interferencia analízissel követtük nyomon.

A SD-k kialakulását és a hemodinamikai válasz lefutását fokális iszkémiás modellben már tanulmányozták, bár a membránpotenciál és a CBF válasz szinkron térbeli monitorozására még nem nyílt korábban lehetőség. Viszonylag keveset tudunk a multifokális iszkémia során bekövetkező változásokról is. Nem ismert továbbá, hogy olyan esetekben, ahol nem jön létre kifejezett iszkémiás fókusz, hanem a perfúziós deficit homogén módon érinti a kérget, megjelennek-e depolarizációs hullámok, és ha igen, illetve azok milyen karakterisztikával és neurovaszkuláris csatolással járnak.

## **2. Célkitűzés**

Tekintettel arra, hogy a fiziológiástól eltérő agyi véráramlás változás potenciálisan

hozzájárulhat az SD-okozta szekunder károsodáshoz, célunk volt az iszkémia súlyosságának tükrében jellemezni a megjelenő depolarizációs hullámhoz csatolt vérátáramlás változásokat. Ehhez két különböző kísérletsorozatot végeztünk: modellként első esetben egy kétoldali arteria carotis okklúzióval kombinált hipovolémiás hipotenzio által létrehozott globális előagyi iszkémiát, második esetben mikrogyöngyök infúziójával kiváltott permanens, multifokális iszkémiát alkalmaztunk. Szintén vizsgáltuk az SD és a hemodinamikai válasz kinetikája közti összefüggést a fenti esetekben. Vizsgáltuk továbbá az SD-k létrejöttének körülményeit, és a terjedés jellemzőit különböző súlyosságú iszkémia esetén.

### **3. Anyagok és módszerek**

Az állatokat spontán légzésük megtartása mellett N<sub>2</sub>O és O<sub>2</sub> 1:2 arányú elegyéhez kevert halotánnal (1-2,5 %) altattuk, testhőmérsékletüket egy visszacsatolásos szabályozókört tartalmazó melegítőpad segítségével állandó hőmérsékleten tartottuk (37,1 – 37,4 °C).

Globális előagyi iszkémiás modellünkben összesen 13 felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányt használtunk (n=13, 300-450g). A bal artéria és véna femoralisba egy-egy kanült helyeztünk. Az artériás kanült az artériás középnyomás monitorizálására, a vénás kanült a kísérlet egy későbbi szakaszában történő vérvételre használtuk. Sebészeti varrófonál segítségével aláöltöttük mindkét oldali arteria carotis communis (common carotid artery-CCA). A kísérlet egy későbbi szakaszában mindkét oldali carotis elszorításával (two vessel occlusion- 2VO) globális előagyi iszkémiát idéztünk elő.

Mikroembolizációs modellünkben (n=13 hím felnőtt Sprague Dawley patkány, 300-450g) a fentiek szerint leírtan jártunk el altatás és vérnyomás monitorozás tekintetében. A carotis externa (external carotid artery-ECA) és CCA ágak proximális szakaszát ligáltuk, majd egy polyethilen katétert vezettünk a CCA-n keresztül a carotis internába (internal carotid artery-ICA).

Mindkét esetben a koponyát sztereotaxiás keretben rögzítettük, majd a jobb parietális kéreg felett fúró segítségével egy kb. 4 mm átmérőjű csontablakot készítettünk. A kraniotómia köré fogászati akrilátból egy ellipszis alakú kamrát alakítottunk ki, melybe egy be- és egy kivezető nyílást is beépítettünk. A kamrát mesterséges cerebrospinalis folyadékkal (artificial cerebrospinal fluid- aCSF) töltöttük fel. A kraniotómia területén óvatosan eltávolítottuk a dura matert, majd a kialakított kamrát mikroszkópos fedőlemezzel zártuk le, és egy speciális kétkomponensű ragasztóval rögzítettük. Az aCSF folyamatos

áramlását egy perisztaltikus pumpa segítségével biztosítottuk (25 $\mu$ l/min keringetési sebesség), a kamrában uralkodó nyomást a fiziológiásnak megfelelő értéken stabilizáltuk.

Mindkét esetben a feszültségfüggő festéket aCSF-ben oldottuk, majd az oldattal a koponyaablakban feltárt kérgi szövetet feltöltöttük. Az inkubációs idő elteltével a felesleges festéket kimostuk. Ezt követően kezdtük meg az adatgyűjtést, minden esetben 10 perc nyugalmi állapotot regisztráltunk.

Inkomplett előagyi iszkémiánál 2VO-t hoztunk létre mindkét oldali CCA köré vezetett fonalak elhúzásával és rögzítésével. A sikeres 2VO jeleként értékeltük a vérnyomás hirtelen kiugrását, mely a baroreceptor reflex jele volt. Ezt követően, 10 perc elteltével a vénás kanülön történő lassú, folyamatos vérvétellel hipovolémiás hipotenziót hoztunk létre. A vérvételt addig folytattuk, míg az artériás középnyomás 40 Hgmm-t elérte, majd konstansan 35-45 Hgmm között tartottuk szükség szerinti vérvétellel. További 20 perc elteltével a kísérletet vagy vénás KCl adásával (1M 0,5 ml KCl), vagy halotán túladagolással fejeztük be, és 10 perc biológiai zérót regisztráltunk.

Mikroembolizációs modellünk esetén multifokális iszkémiát hoztunk létre az ACI-be helyezett kanülön keresztül történő, 45-53 $\mu$ m-es mikroyöngyök szuszpenziójának adásával (2000 partikulum/0,6 ml szuszpenzió). Az optikai jeleket 60 percig regisztráltuk az iszkémia indukcióját követően, majd a kísérletet halotán túladagolással, és 10 perc biológiai zéró felvételével fejeztük be.

Kutatócsoportunk olyan multimodális képalkotó eljárást dolgozott ki, mely egyszerre képes detektálni a depolarizációs hullám során létrejövő transzmembrán potenciál és csatolt hemodinamikai változásokat a vizsgált kortikális területen. A membránpotenciál változás vizsgálatához olyan feszültségfüggő festéket alkalmaztunk, mely a neuron és astroglia sejtmembránhoz kötődik, és fluoreszcenciája a csökkenő transzmembrán potenciállal szinkron nő. A fluoreszcencia detektálásához az agykéreg- a festék gerjesztése érdekében- LED [„light-emitting diode”] fényforrással világítottuk meg (620-640 nm). A felvételekhez monokróm CCD kamerát alkalmaztunk (Kamera 1), melyet sztereo-mikroszkóphoz erősítettünk. Az agyi vértérfogat és Hb szaturáció változásának detektálásához a visszavert fény intenzitását (intrinsic optical signal-IOS) detektáltunk egy másik kamera segítségével (Kamera 2). Az agyi vértérfogat vizsgálatához a koponyaablakot zöld LED fényel világítottuk meg. A megvilágító fény hullámhossz tartományát a hemoglobin izoszbetikus tartományának megfelelően állítottuk be (540-550 nm), így mind az oxí, mind a deoxi-Hb egyenlő mértékben abszorbeálja a fényt, azaz a visszavert fény nagysága az össz-Hb mennyiség (agyi vértérfogat) függvénye. Az agykérgi mikroérhálózat deoxi-Hb arányának

jellemzésére piros LED fényt használtunk. A kapott optikai jelek jó korrelációt mutattak a kérgi deoxi-hemoglobin aránnyal, mivel a piros fény hullámhossz tartományában (620-640 nm) a deoxi-hemoglobin fényelnyelése jóval meghaladja az oxihemoglobin fényelnyelését.

Az agyi véráramlás jellemzésére laser speckle kontraszt (LSC) analízist alkalmaztunk, mely során az agykéreg egy lézer dióda (736 nm) segítségével világítottuk meg. A nyers lézer képeket a Kamera 1-el detektáltuk, mely megegyezett a feszültségfüggő festék emittanciáját detektáló kamerával. A kísérlet befejezése után a nyers képekből elkészítettük a vizsgált kéregrészlet áramlási térképét. Ehhez a folyamathoz az Image-Pro Plus nevű számítógépes programot használtuk.

Globális előagyi iszkémia esetén a piális arteriola átmérő meghatározásához a zöld megvilágítással készült képsorokat használtuk.

Ahhoz, hogy számszerűsíteni tudjuk egy adott területen a feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitás változását, az agyi véráramlást, illetve a zöld- és piros reflektancia változásait, a kapott képeken kis területeket, ún. area of interest (AOI, 3 x 3 pixel) jelöltünk ki, és meghatároztuk ezen területek szürke szintjének változásait az idő függvényében. Az AOI-k helyét úgy választottuk meg, hogy azok érmentes területen helyezkedjenek el, és az összes modalitású képen helyük egybeessen.

Az iszkémiás károsodás progressziójának vizsgálatához 7 hím Sprague Dawley patkány (360-430 g) esetén alkalmaztunk mikroembolizációt, 24 óra elteltével az állatokat dekapitáltuk, az agyakat felszeleteltük, majd 2,3,5-triphenyltetrazolium klorid (TTC) festést követően 4% paraformaldehidben inkubáltuk. Mivel a TTC festés nem kellően szenzitív mikoinfarktusok kimutatására, a festett szeleteket paraffinba ágyaztuk és 5µm-es szeleteket készítettünk. Hematoxilin/eozin (HE) festést követően mikroszkóp alatt értékeltük az eredményt.

## **4. Eredmények**

### **Iszkémia indukció során bekövetkező változások a vizsgált paraméterekben**

A 2VO kezdetekor az artériás középnyomás hirtelen csökkenése ( $70 \pm 4$  Hgmm-re), majd azonnali emelkedése ( $107 \pm 6$  Hgmm) volt észlelhető az intakt baroreceptor reflex jeleként. Ezt követően a középnyomás a vérvétel- azaz hipovolémiás hipotenzio indukciójáig ezen magasabb értékeken maradt. A fokozatos vérvétellel együtt az artériás középnyomás is



csökkent, majd  $40\pm 4$  Hgmm körül maradt a kísérlet befejeztéig. Az agyi vérátáramlás változás követte a vérnyomásváltozás kinetikáját minimális látencia mellett; az okklúziót követően létrejövő átmeneti rövid perfúzió esést az artériás középnyomással szinkron bekövetkező áramlásnövekedés jellemezte, mely kb 78%-on állapodott meg, majd vérvételt követően kb.  $39\pm 5$  %-on stabilizálódott.

A piális arteriola kaliber a vizsgált érszakaszon hirtelen csökkent az okklúzió kezdetekor- az alap  $80\pm 5$   $\mu\text{m}$ -ről  $60\pm 7$   $\mu\text{m}$ -re szűkült, majd ezt követően  $77\pm 6$   $\mu\text{m}$  körüli értéket vett fel.

A zöld IOS hirtelen emelkedett az okklúzió kezdetekor az agyi vérátáramlás eséssel egy időben. Hasonló változás következett be vérvétel alatt. Ezzel ellentétesen változott a piros IOS kinetikája, mely mind az okklúzió kezdetekor, mind vérvétel alatt csökkent.

Az embolizációt sikeresnek tekintettük, amennyiben a mikrogyöngyök a felvett képsorokon láthatóak voltak a vizsgált kérgi terület piális arterioláiban. A mikrogyöngy beadását követően a gyöngy által okozott okklúziótól disztálisan eső érszakaszban az áramlás hirtelen csökkenése volt megfigyelhető, míg a teljes vizsgálati területen az agyi vérátáramlás heterogén csökkenése volt jellemző; az áramlás a kortikális terület 8%-án nem érte el az 50 %-ot, 51-91% között alakult a cortex kb. 61%-án, míg 91% felett maradt a vizsgált terület 30%-án. A mikroembolizáció okozta infarktusz kialakulásának igazolására 24 órával a beadást követően TTC-festett agyszövetek morfológiai vizsgálata történt, mely kiterjedt kortikális és szubkortikális léziókat igazolt. A léziók kialakulását a HE festés eredménye is alátámasztotta.

### **A kúszó depolarizációk és csatolt hemodinamikai válaszok jellemzése**

A globális előagyi iszkémia modellben az SD-k megjelenésére vonatkozóan a következőket tapasztaltuk: (i) az SD nem jelentkezett a vizsgálati periódusban ( $n=4$ ), (ii) az SD a hipovolémiás hipotenzio létrehozása során, vérvétel alatt jelentkezett ( $n=3$ ), (iii) az SD a hipovolémiás hipotenzio kialakítását követően jelentkezett ( $n=4$ ). Bilaterális okklúzió és az okklúzió-vérvétel közötti periódusban depolarizációt nem észleltünk egyetlen esetben sem. Az átlagos látencia a hipovolémiás hipotenzio indukciója és a hullám ezt követő megjelenése közt  $4.6\pm 0.8$  min volt.

Kísérletenként egy SD-t detektáltunk, mely zömében fronto-laterális kérgi területről érkezett és kaudo-medialisan terjedt (9 kísérletből  $n=8$  esetben). Egy esetben a terjedési irány retrográd volt (kaudo-laterál/fronto-mediál). Az átlagos terjedési sebesség  $2.8\pm 0.2$

mm/min volt.

A depolarizációs hullám kinetikája, és a transzmembrán potenciál rendeződése alapján három SD típust különböztettünk meg:

Terminális SD (n=4): azonnali depolarizáció, melyet repolarizáció nem követ- jellemző az iszkémiás magra, illetve szívmegállást követően a kortexen végighaladó depolarizációs hullám kinetikájára. Ezen depolarizációs hullámok jellemzően elnyúló agyi vérátáramlás csökkenéssel járnak.

Köztes, elnyúló SD (n=3): azonnali, depolarizáció, melyet késői repolarizáció követ, tranziens agyi vérátáramlás csökkenéssel.

Tranziens SD (n=2): tranziens depolarizáció, a transzmembrán potenciál azonnali rendeződésével, típusosan úgynevezett no-flow válasszal járnak, mely során a kortikális vérátáramlás a depolarizációt megelőző értéken marad.

A piros és zöld IOS szimultán változott az SD-kel; a feszültségfüggő festék fluoreszcenciájának erősödésével szinkron mind a piros, mind a zöld reflektancia hirtelen növekedett.

A multifokális iszkémia kísérletsorozatban, a 7 kísérletben összesen 31 depolarizációs hullámot sikerült azonosítani, melyek minden esetben jellemzően az iszkémia indukció után jelentek meg. A depolarizációs hullámok száma az 1 órás megfigyelés idő alatt 2-12 között változott kísérletenként. A koponyaablak által látótérbe hozott kortikális területen összesen 5 fókuszot sikerült detektálni (4 különböző patkányból származó adat), a többi esetben a hullám távolabbi fókuszból érkezett.

A látótérbe eső fókuszból kiinduló hullámok 3 különböző kinetikát mutattak, melyek megfelelnek a fentebb, globális előagyi iszkémia során leírt kategóriáknak: rövid, tranziens (n=3), köztes, elhúzódó (n=1) és terminális SD (n=1). Az köztes, elhúzódó és terminális depolarizációk sugárirányban terjedtek a távolabbi kortikális régiók felé. Az SD fókuszból, és attól távolabbi pontokból nyert agyi vérátáramlás adatok igazolták, hogy az SD kialakulását megelőzően az agyi vérátáramlás a később fókusznak megfelelő területen bizonyult a legalacsonyabbnak, és ettől távolodva fokozatosan emelkedett. Az SD fókuszában a klasszikus hiperémiás válasz elmaradt; vagy minimális áramlás növekedést (n=2), vagy no-flow választ (n=3) azonosítottunk, függetlenül az SD típusától. A hiperémiás csúcs nagysága ezzel szemben nőtt a fókusztól való távolsággal. A hiperémia lecsengését követően a vérátáramlás az SD megjelenése előtti szinten stabilizálódott.

A detektált SD-k zöme tranziens típusú volt, és távolabbi pontból terjedt be a látótérbe; leggyakrabban a frontális-frontolaterális régiókból (n=19), 5 esetben a koponyaablaktól

laterálisan eső területekről, és mindössze 2 esetben kaudális irányból. A multifokális eredetet alátámasztotta, hogy az egyes kísérleteken belül a terjedés iránya változott,- azaz az egyes hullámok más-más fókuszból érkezhettek.

Számos SD kioltódott a látótérben nyomonkövethető terjedésük során. Ezen esetekben az agyi vérátáramlás a látótérben viszonylag homogén eloszlást mutatott közvetlenül a hullám áthaladása előtt. Jellemzően az SD-hez csatolt vérátáramlás változás hiperémia volt, melynek amplitúdója a terjedés folyamán fokozatosan csökkent.

A zöld és piros IOS szinkron változott az agyi vérátáramlás és feszültségfüggő festék fluoreszcencia változásával- a kioltódó depolarizációval együtt a csatolt hemodinamikai válasz megszűnésének megfelelően a detektált IOS jelintenzitás szintén lecsökkent.

Két kísérlet során olyan SD-eket észleltünk, melyek egy adott kérgi területet megkerülve terjedtek tova. Az adott területek potenciálváltozásait elemezve terminális depolarizáció nem alakult ki, agyi vérátáramlás értéke közvetlenül a depolarizáció megjelenése előtt 40 és 100% között változott.

A hiperémiával járó CBF válasz a zöld IOS csökkenésével járt- tekintettel a megnövekedő agyi vértérfogatra, mely több zöld fényt abszorbeál. A piros az egyes SD-kkel IOS bifázisos kinetikát mutatott: (i) korai szignál növekedés (Hb szaturáció)-mely a vérátáramlás növekedéssel egybeesett (ii) meredek csökkenés (deszaturáció) a hiperémia csúcs kialakulását követően. A domináló fázisok alapján a következő piros IOS típusok voltak megfigyelhetők: 1. Típus: n=5 domináns kezdeti fázis; 2. Típus n=7: azonos nagyságú fázisok; 3. Típus: n=12 domináló késői fázis. Egyetlen esetben- mikor az SD hipoperfúziós válasszal járt, a piros reflektancia monofázisos csökkenését figyeltük meg (Hb deszaturáció).

## **5. Megbeszélés**

Az iszkémia indukálta SD-k hozzájárulnak a szöveti károsodás progresszív súlyosbodásához, megjelenésük potenciálisan kedvezőtlenebb neurológiai kimenettel korrelál. A jelenség komplexitása miatt továbbra is fontos az állatmodellek és kombinált vizsgálati módszerek alkalmazása, amelyekkel az SD jelenség létrejötte, kinetikája, valamint az SD-re adott hemodinamikai válasz lefutása térben és időben egyidejűleg tanulmányozható.

Kísérleteinkben globális előagyi, illetve multifokális iszkémiás állatmodellt alkalmaztunk, melyekben a megjelenő SD-k kinetikáját, valamint a csatolt hemodinamikai

változásokat vizsgáltuk. Elemeztük továbbá a kérgi perfúzió változásait, melyek elősegítik az SD létrejöttét. A klasszikus egy-pont mérésen alapuló elektrofiziológiai és perfúziós vizsgálatok helyett multimodális képalkotó eljárásunk segítségével lehetőség nyílt szimultán láthatóvá tenni és megfigyelni a fenti változókat, nagy tér és időbeli felbontásban.

Globális előagy iszkémia modellünkkel az elnyújtott, lépcsőzetesen kialakuló iszkémia hatását kívántuk jellemezni, melyet 2VO és tartósan fennálló hipotenzióval hoztunk létre. A módszer lehetőséget nyújt az agyi mikroérhálózat kompenzációs képességének, valamint annak kimerülésekor bekövetkező változások vizsgálatára: a 2VO létrejöttkor hirtelen megnövekedő artériás középnyomás a baroreceptor reflex, míg a hirtelen csökkenő agyi vérátáramlás változás az előagyi vérellátás hirtelen csökkenésének jele. A szisztémás hipotenzió további kérgi perfúziós, valamint vérnyomás csökkenéssel jár. Ezek együttesen a kimerült autoregulációs kapacitás jelei. Az iszkémia indukcióval szinkron bekövetkező zöld IOS intenzitás növekedés az össz Hb/agyi vértérfogat csökkenés jele, míg a piros reflektanciában bekövetkező csökkenés a Hb deszaturációját igazolja.

Második, multiplex mikroembolizációs modellünkben a multifokális iszkémia hatását kívántuk vizsgálni. A perfúziós deficit közvetlen a mikroyöngyök beadását követően, illetve az iszkémia korai fázisában megfelel a korábban MRI vizsgálatok során észlelteknak. Egyértelmű iszkémia indukált szöveti károsodást azonosítottunk a kortikális és szubkortikális régiókban a mikroyöngyök beadását követő 24 óra elteltével, melyet hisztológiai vizsgálatokkal támasztottunk alá. Az áramlás eloszlása irreguláris, heterogén volt, köszönhetően a heterogén mintázatú mikroyöngy okozta érobstrukciónak. Bár az agyi vérátáramlás azonnal csökkent az embolizációt követően, az átlagos perfúzió-csökkenés kevésbé volt kifejezett, mint globális modell esetén.

Globális modellünkben minden kísérlet esetén csak egy SD alakult ki, 16-17 perccel a 2VO-t követően, vérvétel alatt, vagy a vérvétel okozta hipovolémiás hipotenzió kialakítását követően. Az első SD fokális iszkémia indukcióját követően jellemzően percekben belül kialakul. A SD-k megjelenésének a kísérleteinkben tapasztalt viszonylag hosszabb látenciája az iszkémia indukciójához képest feltehetően a fokozatosan progrediáló perfúziós deficit eredménye, szemben a hirtelen kialakuló áramlás csökkenéssel- pl. érelzáródás következtében.

Ezzel szemben a multifokális modellben számos (2-12) SD –t figyeltünk meg az egy órás megfigyelési idő alatt. Az SD megjelenésekor mért magasabb kérgi vérátáramlás érték a fentebbi globális modellhez képest azt igazolja, hogy önmagában a perfúzió csökkenés

nem vezet SD kialakulásához, és nem lehet megállapítani egy konkrét perfúziós küszöbértéket, mely az SD-k kialakulásához vezet. A perfúziós deficit mértékén kívül további faktorok is szükségesek az SD kialakulásához, főként, ha az iszkémia heterogén. Így pl. az extracelluláris ion ( $K^+$ ) gradiens hirtelen változása is előmozdíthatja SD kialakulását, még relatív enyhe lokális kérgi vérátáramlás csökkenés esetén is.

Globális modellünkben a depolarizáció kialakulásának fókusz a látótéren kívül esett, az SD csillapítatlanul terjedt tova a kortexen. A frontolaterális terjedési útvonal frontális területi fókuszot feltételez, vagy az SD mélyebb, iszkémia szenzitív szubkortikális struktúrákból származhat. Esetlegesen, a hullám eredhet a striátumból, és egy anterior terjedési útvonalon (claustrum, nucl. accumbens) érheti el a kortextet melynek alapja a striatumban elhelyezkedő, kevert iszkémia szenzitivitású sejtek jelenléte, szemben a kéreg e tekintetben viszonylag egységes citoarhitektúrájával.

Multifokális iszkémia esetén a létrejövő depolarizációk száma és fókusz jelentős variabilitást mutatott. Öt esetben a fókusz a látótérben helyezkedett el, de nem lehetett bizonyítani, hogy egy kialakulóban lévő iszkémiás mag régió peremét jeleznék, mivel többek közt terminális depolarizáció nem jött létre az adott területen. Ez alátámasztja azt a feltételezést is, hogy az SD-k nem feltétlenül az iszkémiás magból, hanem a penumbra területéről is eredhetnek. Szintén igazoltuk, hogy az SD kialakulását megelőzően a kérgi vérátáramlás a fókusz területén volt a legalacsonyabb, valamint a csatolt hiperémiás válasz amplitúdója a legkisebb volt ezen a területen. Ez arra utal, hogy viszonylag egységes szöveti struktúra esetén (pl. rágcsáló kortex) a depolarizáció ott alakul ki, ahol a kérgi vérátáramlás csökkenés a legnagyobb mértékű. A depolarizáció időtartama szintén elnyújtottabb a fókuszban, szemben a disztálisabban elhelyezkedő kérgi területekkel, míg a terjedés sebessége csökken a fókuszról távolodva. Az SD terjedési tulajdonságait feltételezhetően több faktor, így az (i) extracelluláris  $K^+$  eltávolításának lassulása, (ii) az extracelluláris tér csökkenése (sejt ozmotikus duzzadása) valamint (iii) megnövekedett extracelluláris  $K^+$ /glutamát koncentráció befolyásolhatja.

Kísérleti módszerünk legnagyobb előnye, hogy egymással összefüggésben vizsgálható az SD-k kinetikája valamint a csatolt vérátáramlás változások. A depolarizáció hossza feltételezhetően a csatolt hiperémia hosszát is meghatározza. Mivel a membránpotenciál helyreállása- így a normális elektromos aktivitás visszatérése ATP-függő  $Na^+/K^+$  pumpához kötött, az agyi vérátáramlás alapállapotra történő visszatérése hiperémia után késik a megnövekedett energiaigény miatt. Másfelől, depolarizációhoz kötött kúszó iszkémia potenciálisan elnyújtja a repolarizációt, mivel a tápanyag ellátás,- mely a

repolarizáció kialakulásához szükséges- nem elégíti ki a metabolikus igényeket.

Globális modellünk esetén a repolarizáció vagy elnyúlt volt, vagy a transzmembrán potenciál nem rendeződött, és csak elvétve alakult ki rövid tranziens SD. Csatolt áramlási tranziensek tekintetében egy esetben sem észleltünk hiperémiás áramlásváltozást. Iszkémia esetén az SD-vel járó hemodinamikai változást zömében vazokonstriktív mechanizmusok befolyásolják, melyek a normál hiperémiás válasz eltűnéséhez, és hipoémiás válasz kialakulásához vezetnek. Súlyos esetben a hiperémia teljes mértékben eltűnik, és kúszó kérgi iszkémia alakul ki. Összességében, a megnyúlt repolarizációs idő, valamint a hipoperfúzió irányába tolódó csatolt áramlás változás a szöveti energia krízis egyértelmű jele, és a membránpotenciált helyreállító mechanizmusok (ionpumpák) kimerülését tükrözi. Ezen felül, a terminális depolarizáció, és a kérgi kúszó iszkémia megjelenése az irreverzibilis metabolikus krízis és neuronkárosodás jele.

Multifokális modellünkben az SD-k zömében rövid, tranziens típusúak voltak és hiperémiával jártak- habár a fiziológias hiperémiás áramlásváltozáshoz képest a hipoémiás elemeket (kezdeti rövid hipoperfúzió és késői megnyúlt oligémia) nem figyeltünk meg. Feltételezzük, hogy mind a rövid bevezető hipoperfúzió, mind a késői oligémia ezen esetekben nem vehető ki tisztán, tekintettel hogy a kérgi vérátáramlás már az SD megjelenése előtt alacsony - köszönhetően az iszkémia indukciónak. A piros IOS diverz kinetikája a tranziens hiperémiás válaszok esetén további metabolikus következményeket jelent. Az 1 és 3 típusú piros IOS intenzitásváltozás minden esetben hiperémiával együtt detektálható, de független a hiperémia nagyságától. Ez alapján önmagában a hiperémiás válasz létrejötte nem tükrözi a depolarizáció következtében kialakult metabolikus állapotot.

Multifokális modellünk lehetőséget nyújt heterogén metabolikus státuszú szövetben az SD-k kialakulásának és terjedésének nyomon követésére. Megfigyelhető, hogy az SD-k egy része fokozatosan elhal terjedés közben. Feltételezhetően ezen SD-k olyan extracelluláris ion grádiensek ellenében haladnak, melyek nem támogatják az SD terjedését (csökkent extracelluláris  $K^+$  szint megnövekedett reszorpció miatt, megnőtt  $Mg^{2+}$  koncentráció). A csökkent extracelluláris víz reszorpció a gliális aquaporinokon keresztül szintén hozzájárulhat a jelenséghez.

Egyes kísérletekben olyan SD terjedési mintázatot figyeltünk meg, amely kikerült egy jól körülhatárolható kérgi területet. Ezen esetekben a hullámok nem csillapodtak, sőt, a fentebb említett kérgi területek körül keringtek majd irregulárisan terjedtek tova. Az SD-k megjelenésekor ezen régiókban a környező területekhez képest alacsonyabb agyi

vérátáramlás értékeket mértünk. Ismereteink szerint SD olyan területeken nem halad keresztül, ahol (i) megelőzően terminális depolarizáció alakult ki, vagy (ii) epileptiform elektromos aktivitás zajlik. Infarktus kialakulását nem tudtuk igazolni ezen területeken (nem jött létre terminális depolarizáció), így ez nem járulhatott hozzá a terjedés gátlásához. Bár fokális görcstevékenység megjelenése ismert mikroembolizáció esetén, módszerünk nem alkalmas ilyen jellegű potenciálváltozások kimutatására. Ezeket figyelembe véve csupán az igazolható, hogy a fentebb leírt területek bár nem vesznek részt a depolarizációs hullám terjedésében, a terjedést nem egy irreverzibilisen károsodott szöveti rész gátolja.

## **6. Konklúzió**

Globális előagyi iszkémia során végzett multimodális vizsgálataink igazolták, hogy terminális, és köztes depolarizációk rendszerint hipoperfúzióval járnak, mely elnyújtott vagy tranziens kinetikát követ, míg tranziens depolarizáció esetén, ahol a transzmembrán potenciál rendeződése gyorsan lezajlik- rendszerint nem mutatható ki egyértelmű áramlás változás, azaz „no flow response” jön létre. Kevésbé súlyos perfúziós deficit esetén-, mint multifokális agyi iszkémia során- rövid, tranziens depolarizációk rendszerint hiperémiás agyi vérátáramlás változással járnak.

A hiperémiával járó válaszok esetén az áramlásváltozás azonos amplitúdója és hossza mellett a Hb szaturáció eltérő kinetikát mutat. Ezek lapján önmagában a tény, hogy a depolarizációs hullám hiperémiával von maga után, nem tükrözi teljes mértékben a háttérben zajló metabolikus állapotokat. Ezért a pontos metabolikus krízis, és a szöveti túlélés megítélésének érdekében fontos a hemoglobinszaturáció, laktát és szöveti pH változás követése.

Globális előagyi iszkémiás modellünk eredményei klinikailag relevánsak lehetnek a hipoxiás-iszkémiás agykárosodással járó kórképek esetén,- mint pl. szívmegállás- míg multifokális iszkémia modellünk jellemezheti a mikroembolizációval járó kórképek (cardio-pulmonalis shunt és következménye), valamint multiinfarktus-dementia patomechanizmusát. Mindemellett, az SD pontos patognómiai szerepe további vizsgálatokat igényel.