

Beszámoló

A projekt legfontosabb célkitűzése az volt, hogy létrehozzunk egy olyan nagyállat-modellt, mely által lehetővé válik az érett újszülöttek perinatális aszfixiát követően kialakuló neuronális károsodással járó kórképének, az ún. hipoxiás-iszkémiás enkefalopátiának (HIE-nek) potenciálisan klinikai transzlációra is alkalmas tanulmányozása. Kísérleti alanyként az újszülött sertést választottuk, egyrészt azért, mert ez a faj jól tükrözi az érett humán újszülött fiziológiai állapotát, valamint a központi idegrendszer struktúrája, fejlettségi állapota, metabolikus aktivitása is jelentős hasonlóságokat mutat az emberi újszülöttel, különösen a gyakran alkalmazott rágsáló-modellekhez képest. Másrészt, az újszülött malaccal az SZTE ÁOK Élettani Intézetében a Prof. Bari Ferenc által alapított Cerebrovaszkuláris Laboratóriumban már a projekt kezdete előtt 15 évvel megkezdődtek a cerebrokortikális mikrocirkuláció vizsgálatára irányuló kutatások, így jelentős tapasztalattal rendelkezünk a malacon végzett műtéti beavatkozások tekintetében, azonban az alkalmazott eljárások nem tették lehetővé a 4-6 órás túlélési perióduson túlmutató időpontok vizsgálatát, adataink többsége a HIE kialakulásának első néhány órájára szorítkozott. Jelen projekt keretében számos olyan módszertani fejlesztést vezettünk be (aszéptikus műtéti technika, folyadékterápia, intenzív hemodinamikai monitoring, kapnográfia, elektroenkefalográfia) melynek segítségével lehetővé vált a HIE kialakulásának megfigyelése a neuronális károsodás kialakulásában kulcsfontosságú 24-48h túlélési periódusra.

Az állatmodell fejlesztésével párhuzamosan az SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékével folytatott kollaboráció keretében részt vettünk egy hazai fejlesztésű lézer folt interferencia (lézer-speckle) alapú képalkotó eszköz tesztelésében. Újszülött malac zárt koponyaablakon keresztüli méréseink során megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas mind a vazodilatátor, mind a vazokonstriktor stimulusok agykérgi mikrokeringésre gyakorolt hatásának szemikvantitatív vizsgálatára. Eredményeink szerint ebben a kísérleti modellben nincs statisztikailag szignifikáns különbség a multi-expozíciós ill. az egy-expozíciós módszerrel készült speckle képek feldolgozásával. Tapasztalataink alapján elkészült egy - kifejezetten a zárt koponyaablakon végzett kísérletekhez adaptált, az intravitális mikroszkópiához eddig is használt operációs mikroszkóp felhasználásával működő lézer-speckle képalkotó eszköz, melynek segítségével a pia mater arteriolák keresztmetszeti változásain túl a véráramlás sebességének változásairól is információ nyerhető mind a felszíni erek, mind a parenchyma mikrocirkulációjáról.

A HIE sikeres modellezéséhez kulcsfontosságú a megfelelő hipoxiás-iszkémiás stressz kiválasztása. Első kísérletsorozatunkban a lélegeztetés felfüggesztésével kiváltott klasszikus aszfixiát hoztunk létre, melynek hosszát az előkísérletek alapján 8 percben állapítottuk meg – hosszabb aszfixia gyakori kardiális szövődmények miatt magas korai mortalitással járt. Modellünk alkalmasnak bizonyult a HIE szubakut periódusában (24h túlélést követően) a kezdeti regenerációt követő másodlagos neurovaszkuláris diszfunkció, valamint a molekuláris hidrogén cerebrovaszkuláris reaktivitásra kifejtett protektív hatásának kimutatására. Azonban az alkalmazott aszfixia nem hozott létre olyan mértékű, szövettani módszerekkel statisztikailag is igazolható robosztus neuronális károsodást, mely lehetővé tette volna a molekuláris hidrogén neuroprotektív hatásának érdemi megítélését. Ezért szükségessé vált egy új hipoxiás/iszkémiás stresszmodell kifejlesztése. Először lézer-speckle műszerünkkel arra kerestük a választ, hogy a szakirodalomból ismert, más munkacsoportok által alkalmazott inzultus-modellek milyen hatást fejtenek ki az agykérgi mikrokeringésre. Azt tapasztaltuk, hogy míg az általunk korábban alkalmazott „klasszikus” aszfixia jelentős agykérgi iszkémiához is vezet, a más munkacsoportok által gyakran alkalmazott csökkentett oxigéntartalmú gázkeverékkel végzett ($FiO_2=0.08-0.1$) lélegeztetés kompenzatorikus véráramlás növekedést hoz létre, melyet az a. carotis communis-ok bilaterális okklúziója nem csökkent lényegesen, így az agykéregben jelentős véráramlás csökkenés nem alakul ki. Ezt a szokatlanul tűnő eredményt a sertés az embertől jelentősen eltérő extracerebrális vaszkuláris anatómiai sajátosságai magyarázzák. A hipoxiás gázzal történő lélegeztetés noha oxigénhiányt létrehoz, ezt azonban nem kíséri az aszfixiát ugyancsak jellemző szén-dioxid felszaporodás, a hiperkapnia. Újszülött patkányokon végzett kísérletek szerint azonban az aszfixia alatti szén-dioxid szint alapvető hatást gyakorol a neuronok válaszkészségére és posztaszfixiás görcstevékenységre a reoxigenizációt követően (Helmy et al. Ann Neurol 69:493–500, 2011). A humán kórállapot modellezésére ezért - szemben a szakirodalomban elterjedt módszerekkel - feltétlenül fontosnak tartottuk az aszfixia mindkét kardinális tünetének reprodukcióját, ezért különböző oxigén és szén-dioxid koncentrációjú gázkeverékekkel végeztünk számos előkísérletet. Végül a 6% oxigént és 20% szén-dioxidot tartalmazó gázkeverék bizonyult alkalmasnak arra, hogy 20 perces belélegeztetésével megfelelő súlyosságú inzultust hozunk létre, mely az állatok többségében a közepsúlyos HIE-nek megfelelő állapotot alakít ki. Az új modellel sikerült olyan mértékű neuronális károsodást létrehozni, mely 24 órás túlélést követően neuropatológiai scoring-gal jól detektálhatónak bizonyult, és így alkalmassá vált a a molekuláris hidrogén neuroprotektív hatékonyságának megbízható megítélésére. Publikálás alatt álló eredményeink szerint a korai reventillációs időszakban, azaz a hipoxiás/iszkémiás

stresszt követően alkalmazott hidrogén-gáz potens neuroprotektív hatást fejt ki, amely a károsodásnak leginkább kitett agykérgi, hippocampalis és törzsdúci területeken egyaránt megfigyelhető, a protektív hatás nemcsak a szövettani pontszámokban, hanem az EEG regenerációjának sebességében és mértékében is megnyilvánult.

A molekuláris hidrogén neuroprotektív hatásának hátterében álló mechanizmusok lényegében feltáratlanok, noha legelfogadottabb a reaktív oxigénfajták közül az egyik legtoxikusabb formára, a hidroxil gyökre kifejtett szelektív antioxidáns hatás, mely hipotézis azonban direkt módon *in vivo* nem vizsgálható. Ezért azokat a mechanizmusokat kívántuk először megvizsgálni, melyek jelentősek a hipoxiás/iszkémiás stressz által létrehozott neuronális sejthalál kialakulásában, vagy éppen a neuronális túlélésben. Új kollaborációs együttműködés keretében (Prof. Kai Kaila, University of Helsinki, Finnország) vizsgáltuk az agyi intersticiális pH (pH_{agy}) változásának szerepét kutatócsoportjával a HIE patogenezisében. A pH_{agy} szerepét azok az újszülött patkányokban végzett kísérletek vetették fel, melyek szerint az aszfixiát követő reoxigenizációs periódusban a pH_{agy} túllövése, alkalózis lép fel, mely szorosan korrelál a HIE-re jellemző epileptiform görcsök kialakulásával, a jelenséget azonban nagyállat modellben még nem igazolták. pH_{agy} méréseink rávilágítottak arra, hogy aszfixia során az artériás vérben mértnél nagyságrendileg súlyosabb acidózis alakul ki az agyban ($\text{pH}_{\text{agy}}=5.8-5.9!$), azonban „rebound” alkalózist nem tudtuk kimutatni a reoxigenizáció során. A patkányban tapasztalt eredményektől való eltérés magyarázata további kutatásokat igényel, de jelzi a rágcsálómodellekből a gírenkefál nagyállatmodellekre történő transzláció korlátait. A HIE során a neuronok részben apoptotikus útvonalak aktiválódásával pusztulnak el, ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni a neuronok túlélésében bizonyítottan fontos antiapoptotikus kinázok (Akt, ERK) aktiváltságának mértékét HIE modellünkben. Western blotting vizsgálataink azt a korábban még nem közölt eredményt adták, hogy az újszülött malac agykéregben és törzsdúcokban az Akt fehérje foszforiláltsága már a kezdetlen kontroll (naiv) állatokban is igen magas és ez nem változik aszfixia hatására a túlélés első 48 órájában, míg az ERK foszforiláltsága aszfixia hatására kismértékben növekszik. Összegyelve ezeknek az antiapoptotikus mechanizmusoknak az aktiválása feltehetően nem játszik jelentős szerepet a molekuláris hidrogén neuroprotektív hatásának mediálásában. A ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim konstitutívan expresszálódik a központi idegrendszeri neuronok egy részében. Aszfixiát követően COX-2 által termelt prosztanoidok és reaktív oxigénszármazékok oxidatív stresszt, neuroinflammációt okoznak, így részt vesznek a hipoxiás-iszkémiás encefalopátia (HIE) kialakításában. Mivel a COX-2 indukálható korai géntermék, ezért a neuronális COX-2

expresszió változása fontos patogenetikai tényező lehet. Korábbi vizsgálatainkban nem tudtuk kimutatni a COX-2 expresszió változását aszfixia után – noha regionális expressziós mintázat különbségek megfigyelhetőek voltak. A fiaskót egyaránt okozhatta a túl enyhe hipoxiás/iszkémiás stressz ill. a rövid (4h) túlélési időtartam. Új HIE paradigmánk felhasználásával azonban az aszfixiás csoportban a parietális és occipitális kéregben, valamint a hippocampus CA3 régiójában a COX-2 immunpozitív neuronok aránya szignifikánsan magasabb volt a kontroll állatokéhoz képest. Az aszfixia + hidrogén csoportban viszont a neuronális COX-2 expresszió lényegében megegyezett a kontroll csoport értékeivel, azaz szignifikánsan alacsonyabb volt az aszfixiás csoportban mért COX-2 expresszióval. A hidrogén neuroprotektív hatásának kifejtésében a COX-2 expresszió-fokozódás mérséklése tehát szerepet játszhat.

A projekt során a projekt keretében végzett kísérletek alapját képezték Dr. Oláh-Németh Orsolya Ph.D. doktori fokozatszerzésének. A projektbe bekapcsolódott még két Ph.D. hallgató számára (Dr. Németh János, Varga Viktória) is a jelen projektben elért eredmények nyújtanak biztos alapot a következő 1-2 éven belüli eredményes doktori eljáráshoz. A projekt kapcsán létrehozott műszeres fejlesztések és a projekt során – a kísérleteket hónapokra leállító, de mindenképpen szükséges – infrastrukturális felújítási munkálatok reményt adnak arra, hogy a jövőben is eredményes, klinikailag releváns neonatológiai kérdések megválaszolására alkalmas laboratórium működjön az SZTE ÁOK Élettani Intézetben.