

Az egészséges agyban a neurovaszkuláris csatolás biztosítja azt, hogy fokozott idegi működés során a lokális vér perfúzió fokozódása fedezze a megnövekedett metabolikus igényeket. A neurovaszkuláris csatolás mechanizmusa- habár ezen alapul pl. az fMRI is- a mai napig nem ismert teljes mélységében. Munkáinkban elsősorban a kúszó kérgi depolarizáció jelenségét használjuk fel a neurovaszkuláris csatolás mechanizmusának és dinamikájának tanulmányozására. Ezen jelenség során ugyanis az agykérgi depolarizációt követően, a regeneráció fázisában nő az agykéreg egyes pontjainak metabolikus aktivitása és helyileg fokozódik a véráramlás is. Kísérleteink egyik részében a depolarizációkat KCl oldat segítségével váltottuk ki. Emellett vizsgáltuk az ischemia, ill. az agykérgi hipoperfúzió során bekövetkező spontán depolarizációkat és a hozzájuk tartozó agykérgi véráramlási és lokális vérvolumen változásait. Különös gondot fordítottunk az öregedéssel összefüggő változások jellemzésére. Kísérleteket végeztünk a nemek közötti különbségek kiderítésére is. A kísérleti munkával párhuzamosan, annak részeként intenzív módszertani és eszközfejlesztést is végeztünk.

Munkánkról mintegy 20 közleményben (impakt faktor ~ 44) számoltunk be szakterületünk vezető nemzetközi folyóirataiban (J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, Neurobiology of Ageing, Neuroscience sb.), eredményeinket előadások formájában ismertettük nemzetközi (Brain11, Brain13, FENS stb.) és hazai kongresszusokon (MIT, MÉT, Magyar Stroke Társaság stb.). A munkában résztvevő PhD hallgatók közül Dr. Mracskó Éva időközben fokozatot szerzett, Dr. Bere Zsófia és Hugyecz Marietta doktori eljárása folyamatban van. A laboratóriumban dolgozó diákkörös hallgatók eredményesen szerepetek helyi és országos tudományos diákköri konferenciákon.

A négy éves periódusban számos kísérleti paradigmát alkalmaztunk: globális agyi hipoperfúziót (előagyi ischémiát), tranziens fokális ischémiát és multifokális ischémiát hoztunk létre, vizsgáltuk a hatásukra kialakuló depolarizációs jelenségeket és a kapcsolódó véráramlási mintázatokat. Mind a fokális (aneurizma elzárásra használt mikro klippel), mind a multi-fokális ischémia (mikrogyöngyökkel) modellünk újszerű, és eredményeink már most is jelentős nemzetközi figyelmet kaptak.

Vizsgáltuk, hogy az akut agyi ischémia és a krónikus agyi hipoperfúzió miként befolyásolja a spontán kialakuló agykérgi depolarizációkat (SD) és a hozzájuk kapcsolódó agykérgi véráramlási képeket. A fokális, vagy globális agyi ischémia hatására spontán létre jövő peri-infarktus depolarizációk (PID-k) és az ezeket kísérő véráramlás változások jelentős szerepet játszhatnak az iszkémia által okozott neuron-károsodás progressziójában.

Halotánnal altatott állatokon dolgoztunk. Vizsgálatainkat zárt koponya ablak technikával végeztük. A koponyaablakot feszültségfüggő festékkel töltöttük fel, melynek fluoreszcenciaintenzitás-növekedése a membránpotenciál csökkenését jelezte. Az agykérget piros (620-640 nm), illetve zöld (540-550 nm) fényel világítottuk meg, melyek reflektanciájából a hemoglobin szaturációjára és a lokális

agyi vérvolumen változásaira következtettünk. Az agykérgi vérátáramlást lézerfolt interferencia kontraszt analízissel határoztuk meg.

A globális előagyi iszkémiát fokozatosan kétoldali a. carotis okklúzióval (10 perc) és vénás vérlebcsoporttal (artériás középnyomás: ≤ 40 Hgmm) hoztuk létre. A vizsgált paramétereket 1 órán át folyamatosan követtük nyomon. Depolarizációs hullám jellemzően $41,2 \pm 3,7$ mmHg-es középnyomás értéknél és $43,4 \pm 4,9$ %-os agyi vérátáramlásnál jelentkezett és döntően anoxiás depolarizációra jellemző kinetikát mutatott.

Annak ellenére, hogy az öregedés a stroke fontos rizikótényezője, keveset tudunk az SD korfüggő megjelenéséről. Célunk volt összehasonlítani az agyi iszkémia dinamikáját, az iszkémia során spontán jelentkező SD-k mintázatát és a reperfúzió dinamikáját fiatal (3 hónapos) és idős (2 éves) patkányokban.

Parietális kraniotómián át vezetett Ag/AgCl elektródával DC-kapcsolt elektrokor-tikogramot, lézer-Doppler próbával agyi vérátáramlást regisztráltunk a penumbrából. A regisztráció során 30 perc kontroll után 30 perces iszkémiás, majd 60 perces reperfúziós szakaszt mértünk. Az iszkémiát mikroaneurizma klippel kialakított tranziens, disztális a. cerebri media okklúzióval és kétoldali a. carotis communis elzárással hoztuk létre.

Ischemia indukálása után az agyi vérátáramlás dinamikája a két csoportban hasonlóságot mutatott (fiatalban a csökkenés az alap $17,5 \pm 3,0\%$ -a; míg idősben az alap $15,7 \pm 3,0\%$ -a). Ugyanakkor, míg fiatal állatokban reperfúzió hatására mérhető reaktív hiperémia jelentkezett ($197,9 \pm 31,2\%$), addig idős állatokban ez nem volt kifejezett ($112,5 \pm 29,2\%$). Fiataloknál 7 kísérletből 4 alkalommal 6 SD-t, míg időseknél 4 kísérletből 2 esetben 1-1 SD-t regisztráltunk. Az SD-t követő hemodinamikai változások is kifejezettebben jelentkeztek fiatalokban (kezdeti hipoperfúzió: $26,3 \pm 3,0\%$; hiperémia: $48,5 \pm 4,0\%$), mint idősekben (kezdeti hipoperfúzió: $9,0 \pm 4,0\%$; hiperémia: $21,7 \pm 3,3\%$).

Eredményeink azt mutatják, hogy idős állatokban kisebb az SD kiválthatósága, ugyanakkor a SD-re adott hemodinamikai válaszok kisebb mértékűek, amely növelheti az ischemia során keletkező SD-k szövetkárosító hatását.

Multifokális iszkémiát $45-53 \mu\text{m}$ átmérőjű mikrogönggyökkel hoztuk létre, melyet az a. carotis internába helyezett kanülön keresztül lassan, $3000 \text{ partikulum}/300 \mu\text{l}/\text{min}$ sebességgel juttattunk be, a változásokat 1 órán keresztül követtük nyomon.

Multifokális iszkémiát követően kísérletenként átlagosan 3 PID detektálható az inzultust követő 1 órában. A depolarizációt a membránpotenciál helyreállása követte, és következetesen hiperémiával járt. A deoxigenált-hemoglobin arány illetve a vérvolumen jellemző piros és zöld reflektancia-görbék variabilitása nagy, ami jelezheti az iszkémia különböző súlyosságát. Kísérleteinkkel jellemezni tudjuk a multifokális iszkémiával együtt járó hemodinamikai változások és PID-k

tulajdonságait. Eredményeink hozzájárulhatnak a multiembolizáció okozta korai patofiziológiai változások leírásához és pontosabb megértéséhez.

Az öregedés megváltoztatja a PID és a hozzá kapcsolódó agykérgi mikrokeringési reakciók kinetikáját.

Az ischémiát a két a. carotis comm. elszorításával és az a. cerebri media 30 perces elzárásával hoztuk létre. A kezdeti véráramlás-csökkenés hasonló volt a vizsgált csoportokban (fiatal [6 hetes], középidős [9 hónapos] és öreg [2 éves]), viszont az öreg állatokban tovább csökkent ischémia alatt ($P < 0,01$). Az idős kor csökkentette a spontán megjelenő SD-k számát ($P < 0,05$), ugyanakkor jelentősen növelte az SD által tartósan depolarizált szövet méretét ($P < 0,01$). A tartósan depolarizált szövet mérete és a súlyosan ischémiás szövet növekedése pozitívan korrelált az öreg csoportban ($P < 0,01$). A tartós SD-k és a társuló súlyos hipoperfúzió jelentősen hozzájárulhat az ischémiás agyszövet korai károsodásához idős korban, még rövid fokális ischémia alatt is. A középkorú állatokban a depolarizációs hullámok elnyújtottabbak ugyan, amelyeket többnyire hiperémiás kérgi válaszok követnek. Ugyanakkor az idős állatoknál megjelenik a negatív csatolás, azaz a depolarizációs hullám tovaterjedését oligémia követi.

Az ischémiás agyban, az SD-vel párhuzamosan zajló tipikus hemodinamikai változások elmélyítik az érintett szövet metabolikus krízisét és rontják a regeneráció esélyét. Célunk olyan modell felállítása volt, melyben megbízhatóan reprodukálható SD-kapcsolt véráramlás válaszokat mérhetünk mind egészséges, mind ischémiás patkányagyban.

Ezekben a kísérletekben két hónapos hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk Tranziens előagyi ischémiát az a. carotis communisok 40 perces elzárásával hoztuk létre (2VO). Kontrollként áloperált állatokat használtunk. A parietális cortex felett kialakított rostralis koponyaablakba DC-kapcsolt elektrokortikogram (DC-ECOG) mérésére alkalmas elektródát és Laser Doppler áramlásmérőt pozícionáltunk. Egy caudalis craniotomián keresztül 1 M KCl oldattal váltottunk ki SD-t. Az egészséges és ischémiás szövet SD-re adott tipikus potenciál- és áramlásbeli változásai között szignifikáns különbség volt. A 2VO csoportban, a sham-mel szemben, a DC kitérés amplitúdója kisebbnek bizonyult ($20,2 \pm 2,7$ vs. $26,2 \pm 1,3$ mV), amit elnyújtott plateau-fázis ($28,7 \pm 10,63$ vs. $8,6 \pm 3,1$ s) és kisebb léptékű repolarizáció követett ($0,8 \pm 0,3$ vs. $2,8 \pm 0,3$ mV/s). Az SD-vel összefüggő, lokális hemodinamikai válasz az ischémiás szövetben kisebb mértékű ($22,6 \pm 9,7$ % vs. $35,27 \pm 8,3$), ugyanakkor hosszabb ideig elhúzódó hyperémiát (274 ± 39 % vs. 37 ± 6 s), valamint alacsonyabb áramlási értékeket mutató oligémiát ($6,31 \pm 3,5$ vs. $31,6 \pm 4,7$ %) regisztráltunk. A modell alkalmas az ischémia alatt létrejövő SD-k pontos jellemzésére. Az SD-re adott hemodinamikai válaszok az ischémiás agyban kisebb mértékűek, ami növelheti az ischémia alatti SD-k szövetkárosító hatását. Jelenleg ezt a vizsgálatot folytatjuk idős állatokon is.

A neurovaszkuláris csatolásban fontos lehet a nemek közötti különbségek ismerete. Ezért felnőtt hím és ovariectomizált nőstény patkányokon megvizsgáltuk a tranziens globális agyi ischemia (TGI) hatását három kapcsoló fehérje (connexin -30, -43 és -45) expressziójára (n=42). TGI-t a carotisok leszorításával és szisztémás hipotenzióval (RR~40 Hgmm) 5 és 10 perc hoztuk létre. A reperfúziót követő 3. napon a hippocampusokból (hp) mintát vettünk és Western blot analízissel vizsgáltuk a fehérje expresszió változásokat. A connexin 30 ($82,7 \pm 2,3\%$) szintben találtuk a legmarkánsabb eltérést, az alacsonyabb Cx30 érték az apoptotikus szignálok terjedését akadályozhatja.

Saját munkával, fizikus kollégák segítségével laser speckle kontraszt analízisre alkalmas eszközt fejlesztettünk ki. Ennek segítségével elsősorban újszülött malac agykérgi mikrokeringését vizsgáltuk és optimalizáltuk a képanalízishez megfelelő expozíciós időket. Ezt követően a módszert adaptáltuk patkányokra is. Munkánk azért nagy jelentőségű, mert az agyfelszín mikrokeringésében számos sebesség komponens található és nem volt korábban ismert, hogy mennyire függ a felbontás a képkalkotáshoz használt 10-100 msec-os időablaktól.

Tovább gondoltuk a foltinterferencia analízis matematikai modelljét és ennek megfelelően új optimalizáló algoritmust fejlesztettünk ki, melynek segítségével az expozíciós időket jobban tudtuk illeszteni a vizsgálandó problémához (aktuálisan a különböző véráramlási profilokhoz (nagyobb arteriolák, kapillárisok, ill. venulák, vénák). Az új algoritmus kidolgozása mellett önálló műszerfejlesztést is végeztünk és a világon egyedülállóan korszerű készülék prototípusát készítettük el az SZTE TTIK Optikai és Kvantumelektronikai tanszéke segítségével (prof. Hopp Béla és mtsai.) A kifejlesztett új módszert és eszközt teszteltük patkányokon és újszülött malacokon is. Ezen eredményeiket több folyóirat cikkben is közzeltük, ill. nemzetközi konferenciákon mutattuk be.

Elkezdtek egy két hullámhosszon dolgozó foltinterferencia analízáló készülék megépítést a készülék segítségével lehetőség nyílik több penetrációs mélységből szerezni mikrokeringési információt, azaz segítségével az agykéreg egymás fölötti rétegeit tudjuk vizsgálni. Az első készüléket 2014-ben laboratóriumunkban kísérletekbe állítottuk és a vele végzett mérésekről benyújtottuk az első publikációt.

Korábban optikai eljárással (pH-szenzitív festékekkel) mértük az agykéreg extracelluláris terében a pH változásokat depolarizációs események során. Az alkalmazott festék gerjesztési hullámhossza azonban átfedést mutat a többi modalitás mérésére használt sávokkal, így szükség volt elektrokémiai módszer kifejlesztésére is. Jelenleg ezen dolgozunk, hiszen egyre valószínűbb, hogy a metabolikus aktivitást és az elégtelen csatolást nem csupán acidózis, hanem átmeneti alkalózis is követi, amely tovább súlyosbíthatja a később kialakuló neuronális károsodást.

A kutatás során számos problémával kellett megküzdenünk. Elsősorban a munkacsoporton belüli fluktuáció (3 kolléganő szült, többen külföldön vállaltak munkát) lassította a munkát, hiszen az újonnan belépőknek hosszabb időt igényelt az igen nehéz mikrosebészeti technikák elsajátítása, valamint a hatalmas mennyiségű adat feldolgozása. Szerencsére a csoport tudományos utánpótlása megoldható, az időközben csatlakozott PhD hallgatók és tudományos diák körösök kiemelkedő tehetségű és szorgalmú fiatalok.

Szerencsés, hogy egyre szorosabban tudunk együttműködni az SZTE TTIK fizikusaival is, akik a módszerek fejlesztéséhez és az eszközök építéséhez tudnak pótolhatatlan segítséget nyújtani.

Összefoglalva:

Csoportunk a nem várt jelentős személyi fluktuáció ellenére továbbra is eredményes munkát tudott végezni. Megmaradt nemzetközi versenyképességünk és eredményeinket a szakma magasan jegyzett folyóirataiban tudtuk közzé tenni. A tématerület további műveléséhez megteremtettük, ill. stabilizáltuk az eszközparkot és folyamatosan tudunk kiképezni a kísérletes orvostudomány ezen ágához értő fiatal szakembereket. Munkánkat továbbra is jelentős hazai és nemzetközi beágyazottság mellett végezzük.