

37. OTDK Biológia Szekció

**A terjedő depolarizáció elégtelen reperfúziót okoz az
akut iszkémiás stroke egér modelljében**

Erős Mihály, Biológia BSc, III. évfolyam

**SZTE SZAOK TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina
Tanszék**

**Témavezetők: Törteli Anna, PhD hallgató; Dr. Menyhárt Ákos,
egyetemi adjunktus**

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETŐ	5
1.1. A STROKE ELŐFORDULÁSA ÉS AZ AKUT ISZKÉMIÁS STROKE (AIS) JELLEMZÉSE	5
1.2. AZ AIS TERÁPIÁJA ÉS AZ ELÉGTELEN REPERFÚZIÓ	7
1.3. LEHETSÉGES MAGYARÁZATOK A REPERFÚZIÓS ELÉGTELENSÉG PATOMECHANIZMUSÁRA	8
1.4. A WILLIS-KÖR ANATÓMIAI VARIÁNCIÁJA	9
1.5. A TERJEDŐ DEPOLARIZÁCIÓ (SPREADING DEPOLARIZATION, SD)	10
1.6. TERÁPIÁS POTENCIÁL: SD GÁTLÁSA	13
2. CÉLKITŰZÉS	16
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
3.1. ÁLLATOK.....	17
3.2. MŰTÉTI BEAVATKOZÁSOK.....	17
3.3. TRANSZKRANIÁLIS ZÖLD FÉNY REFLEKTANCIA (INTRINSIC OPTICAL SIGNAL, IOS) KÉPALKOTÁS ÉS LÉZER FOLT KONTRASZT ANALÍZIS (LASER SPECKLE CONTRAST ANALYSIS, LASCA).....	18
3.4. KÍSÉRLETI PROTOKOLL ÉS MŰTÉT UTÁNI ÁPOLÁS	19
3.5. SD FARMAKOLÓGIAI BLOKKOLÁSA	20
3.6. ÁTLAGOS ARTÉRIÁS VÉRNYOMÁS INVAZÍV MÉRÉSE (INVASIVE MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE, MABP)	20
3.7. STROKE UTÁNI NEUROLÓGIAI DEFICIT ÉRTÉKELÉSE	20
3.8. A WILLIS-KÖR ANATÓMIAI JELLEMZÉSE	21
3.9. HEMATOXILLIN- EOZIN (HE) FESTÉS A SEJTSÉRÜLÉSEK MEGFIGYELÉSÉHEZ	21
3.10. ADATOK ANALIZÁLÁSA ÉS STATISZTIKA.....	22
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	23
4.1. AZ ÁTLAGOS ARTÉRIÁS VÉRNYOMÁS (MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE, MABP) ÉS AZ ARTÉRIÁS VÉRGÁZOK KIÉRTÉKELÉSE 23	
4.2. TÉRBELI EGYBEESÉS AZ ISZKÉMIA ALATTI SD ÉS A KÉSŐBBI ELÉGTELEN REPERFÚZIÓ KÖZÖTT	23
4.3. AZ SD KIALAKULÁSÁNAK KEDVEZŐ INKOMPLETT WILLIS-KÖR ÉS A NAGYOBB CBF CSÖKKENÉS KÖZÖTTI KAPCSOLAT	25
4.4. A NEURONÁLIS SÉRÜLÉS AZ ELÉGTELEN REPERFÚZIÓNAK KÖSZÖNHETŐ	27
4.5. A FARMAKOLÓGIAI SD GÁTLÁS MEGAKADÁLYOZZA AZ ELÉGTELEN REPERFÚZIÓ KIALAKULÁSÁT	29
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	32
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35
IRODALOM ÉS FÜGGELÉKEK.....	36

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIS: acute ischemic stroke, akut iszkémiás stroke

CBF: cerebral blood flow, agyi vérátáramlás

tPA: tissue plasminogen activator, szöveti plazminogén aktivátor

r-tPA: recombinant-tissue plasminogen activator, rekombináns-szöveti plazminogén aktivátor

SD: spreading depolarization, terjedő depolarizáció

ACP: arteria cerebri posterior, hátsó agyi artéria

AB: arteria basilaris, baziláris artéria

DC: direct current, egyenáram

EcoG: electrocorticogram, elektrokortikogram

ACM: arteria cerebri media, középső agyi artéria

GABA: gamma-aminobutyric acid, gamma-aminovajsav

GluR: Glutamate receptor, glutamát receptor

iGluR: ionotropic glutamate receptor, ionotróp glutamát receptor

mGluR: metabotropic glutamate receptor. metabotróp glutamát receptor

AMPA: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav

NMDA: N-methyl-d-aspartate receptor, N-metil-d-aszpartát receptor

2VO: 2 vessel occlusion

IOS: intrinsic optical signal, zöld fény reflektancia

LASCA: laser speckle contrast analysis, lézer folt kontraszt analízis

GN: garcia neuroscore

ACC: arteria carotis communis, közös nyaki artéria

MABP: mean arterial blood pressure, átlagos artériás vérnyomás

PFA: paraformaldehid

ROI: region of interest, érdeklődési régió

ACA: arteria cerebri anterior, elülső agyi artéria

AComA: arteria communicans anterior, elülső összekötő artéria

AComP: arteria communicans posterior, hátulsó összekötő artéria

ACI: arteria carotis interna, belső nyaki artéria

HE: hematoxillin-eozin

20-HETE: 20-hidroxieikozatetranoésav

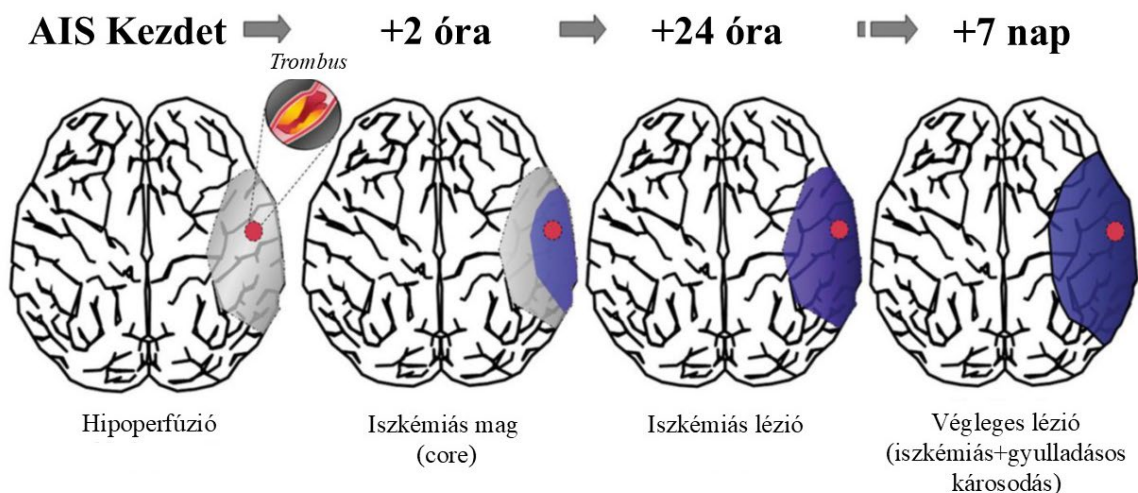
PGF2 α : prosztglandin F2 α

1. BEVEZETŐ

1.1. A stroke előfordulása és az akut iszkémiás stroke (AIS) jellemzése

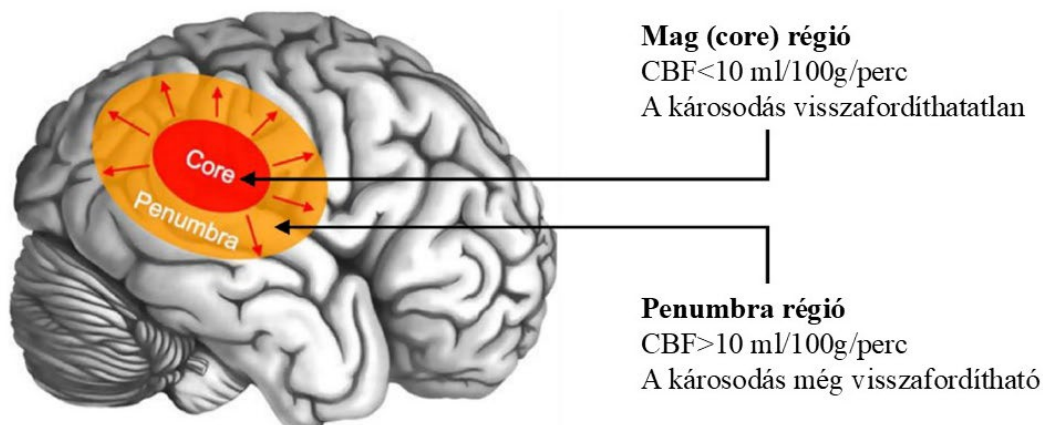
A stroke világszerte a második leggyakoribb halálok az iszkémiás szívbetegségek¹ után, a rokkantsággal társuló kórképek között pedig a harmadik leggyakoribb^{1, 2}. Világszerte minden harmadik másodpercben egy új agyi infarktusos beteget regisztrálnak, ami 12,2 millió esetet számlált az elmúlt 5 évben. A 2019-es adatok szerint az agyi infarktust elszenvedő betegek közel 60%-a 70 év alatti volt, ami felhívja a figyelmet arra, hogy nem csak az idősebb populáció érintett a betegségben². Magyarországon a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) adatai alapján az utóbbi 10-12 éves időszakot figyelembe véve (2012 - 2022) évente 11 540 ember hal meg agyi infarktus következtében. A halált okozó betegségek listájában 1990-től a stroke a második helyet foglalja el hazánkban (www.ksh.hu). A népesség előregedése és a stroke halálozási aránya együttesen 2012 és 2030 között várhatóan 3,4 millióval több stroke-os esetet eredményez³. Ellátásának költségei jelentős terhet rónak mind a társadalomra, mind a betegek családjaira². Míg a stroke ellátás globális költségei meghaladják a 891 milliárd dollárt, a rehabilitáció pénzügyi és társadalmi terhei felbecsülhetetlenek^{1, 2}.

A stroke kockázati tényezői közé tartoznak a nem megelőzhető és megelőzhető tényezők. A nem megelőzhető tényezők közé tartozik az életkor, a nem, valamint a családi stroke kórelőzmények. A megelőzhető kockázati tényezők közé tartozik a magas vérnyomás, a cukorbetegség, a dohányzás, a magas koleszterinszint, az elhízás és az inzulinrezisztencia². A stroke általános tünete a féloldali szájzug lecsüngése, féloldali végtaggyengeség vagy bénulás, beszéd vagy beszéd megértésének zavar, látászavar, esetleg kettőslátás, egyensúlyvesztés és féloldali zsibbadás. A stroke két alapvető típusát különböztetjük meg: **iszkémiás** és **vérzéses**. Az iszkémiás stroke egy agyi artéria elzáródása, a vérzéses pedig egy agyi artéria ruptúrájának következtében alakul ki⁴. A stroke esetek közel 87%-a agyi érelzáródás következtében alakul ki, amit akut iszkémiás stroke-nak, röviden AIS-nek hívnak². Az elzáródást legtöbb esetben egy vérrög, úgynevezett trombus okozza, amely elzárja az agyi eret és blokkolja az érintett agyterület alapvető oxigén- és glükózellátását. Az elzáródás időtartama egyenesen arányos a kezdeti lézió méretével és a neuronális deficit mértékével⁵. Az AIS kialakulását követő első 10 percben a nekrosis területe viszonylag korlátozott kiterjedésű⁵. Az idő előrehaladtával azonban a másodlagos patológiás útvonalak aktiválódása miatt az elhalt terület kiterjedése növekszik. Már 2 órával az elzáródást követően az elzáródott ér ellátási területén szöveti elhalás detektálható⁵. (1. ábra)



1. ábra Az AIS utáni elsődleges lézió időbeli progressziójának sematikus ábrázolása. Az AIS kezdetekor készült ábra (balra) az érelzáró trombust mutatja. A későbbi képek az iszkémiás mag kiterjedését ábrázolják 2, 24 órával és 7 nappal később, amikor a végső lézió térfogata kialakul⁵. Az ábrát Gauberti és munkatársai, 2016 alapján adaptáltuk és módosítottuk.

A vérátáramlás (vagy agyi perfúzió (cerebral blood flow, CBF) csökkenése az infarktus magjában, az úgynevezett **core** régióban a legsúlyosabb (CBF<10 ml/100g szövet/perc vagy 10%-25% CBF), míg a magot körülvevő **penumbra** régió vérrellátása bizonyos ideig kielégítő a kollaterálisok kompenzálása révén (CBF>10 ml/100g szövet/perc vagy 30%-40% CBF) (2. ábra). A core régióban az oxigén- és glükózhány percek alatt irreverzibilis nekrotikus sejthalált okoz, míg a penumbrában a szövet több órán át életképes marad. Számos patomechanizmus, mint például az excitotoxicitás, az oxidatív károsodás, a gyulladás és apoptózis is hozzájárul az idegsejtek pusztulásának folyamatához². Mivel a penumbra régióban a sejtek még életképesek, kezelés nélkül a penumbra iszkémiás maggá fejlődik^{5, 6}. A transzlációs stroke-kutatás elmúlt 50 éve⁵ a másodlagos patológiák mérséklésére összpontosított a neuroprotekciónak jegyében. Az alaptudománytól a klinikai kutatásig tartó kemény munka ellenére mintegy 1000 neuroprotektív molekulából közel 200-at több mint 150 klinikai vizsgálatban teszteltek sikertelenül⁷. Az AIS egyetlen, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala által jóváhagyott kezelése az intravénás szöveti plazminogén aktivator (tissue plasminogen activator, tPA) kezelés (trombolízis)⁷. Mivel a farmakológiai terápiák sikertelenek az AIS-ben, új célpontokat és molekulákat kell azonosítanunk a neuroprotektív kezeléshez.



2. ábra Az iszkémiás mag és a penumbra régió sematikus ábrázolása. A mag egy irreverzibilisen sérült, főként nekrotikus szövet (piros), amelyet egy keskeny, reverzibilisen sérült, menthető szöveti zóna, az úgynevezett penumbra (narancssárga) vesz körül. A mag és a penumbra régiót ábrázoló fekete nyilak célja, hogy ezeket a zónákat az abszolút CBF alapján jellemezzék. Az ábra Kloska és munkatársai, 2016 alapján adaptált és módosított ábra.

1.2. Az AIS terápiája és az elégtelen reperfúzió

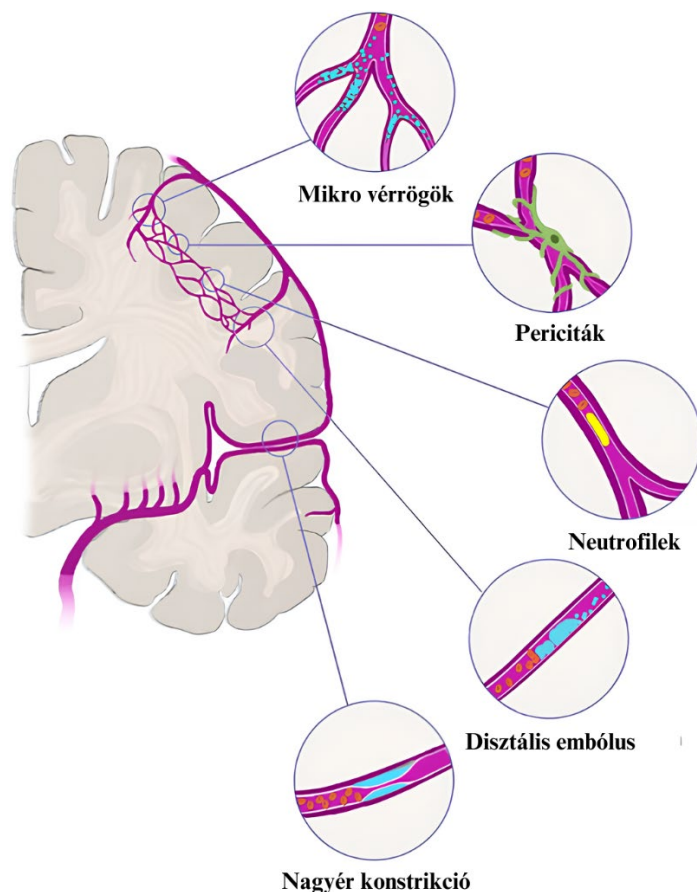
Az AIS gyógyászatában standard protokoll az eret elzáró vérrög gyors eltávolítása trombolízissal és/vagy mechanikai endovaszkuláris thrombektómiával, amely a stroke után 9-24 órában végezhető el. A trombus oldását rendszerint rekombináns szöveti plazminogén aktivátorral (recombinant-tissue plasminogen activator, r-tPA), az eltávolítását katéter segítségével végzik. A rekanalizáció az egyetlen terápiás lehetőség az akut iszkémiás stroke kezelésében és az egyik legjobb előre jelzője a kedvező eredménynek és a mortalitási ráta csökkentésének⁸. Azonban a betegek közel felénél a rekanalizáció hiábavaló és nincs neurológiai fejlődés az optimális angiográfiás eredmények ellenére sem^{9, 10}. A sikeres rekanalizáció ellenére fellépő elégtelen reperfúzió az idősebb korhoz és a gyenge kollaterális keringéshez társítható^{8, 9}.

Ennek következménye az elégtelen reperfúzió. Az elégtelen reperfúzióról azt feltételezik, hogy a kapillárisok szintjén alakul ki, ezért kapilláris „no-reflow” jelenségnek is hívják. További feltételezések szerint a „no-reflow” jelenség hozzájárul az elégtelen reperfúzió kialakulásához, amely az optimális angiográfiás eredmények ellenére is mérsékeli a rekanalizációt és negatívan befolyásolja a stroke-os betegek felépülését. Az elégtelen reperfúzió gyakori előfordulása miatt jelentős klinikai problémát jelent, azonban háttere nem teljesen tisztázott. Emiatt az elégtelen reperfúzió a modern AIS kutatás és a terápia egyik legfontosabb célpontja.

1.3. Lehetséges magyarázatok a reperfúziós elégtelenség patomechanizmusára

A számos mechanizmus közül, amelyek hozzájárulhatnak az elégtelen reperfúzióhoz, az egyik fő tényezőnek a disztális embolizáció tűnik, amelyet a proximális trombusból származó embóliás fragmentumok okoznak, amelyek spontán módon¹¹ vagy az endovaszkuláris beavatkozás során disszociálnak¹². A másik jelentős hozzájáruló tényező lehet a periciták sejtek kontrakciója. A periciták döntő szerepet játszanak az érrendszeri tónus szabályozásában a kapillárisok szintjén¹³, azonban iszkémia hatására gyorsan elhalnak és elzárják a kapillárisokat¹⁴. Egy másik sejttípus, amelyről úgy gondolják, hogy hozzájárul az elégtelen reperfúzióhoz, nem más, mint a neutrofil granulociták. A közelmúltban végzett tanulmányok rágszáló AIS-modellekben a penumbra-zónában megrekedt neutrofilek által okozott kapilláris elakadások kialakulását mutatták ki a rekanalizációt követő első órákban. Emellett más publikációk szerint a leukociták adhéziója, gördülése és felhalmozódása az agyi vénákban, arteriolákban és kapillárisokban jelentősen elősegítheti a hiábavaló reperfúzió kialakulását AIS után¹⁵⁻¹⁷ (3. ábra).

Az agyi érrendszer variáciája is meghatározza a rekanalizáció sikerességét az iszkémiás stroke kezelésében. Az AIS kimenetelét egyértelműen befolyásolhatja a vaszkuláris anatómiai variancia miatt kialakuló alacsony perfúzió az érintett hemiszfériumban. Az alacsony perfúzió beindít egy olyan másodlagos patológiát, amelyet terjedő depolarizációnak (spreading depolarization, SD) nevezünk. Az SD-k jelenlétét összefüggésbe hozták az infarktus méretének terjedésével, illetve manapság a citotoxikus ödéma és a stroke után megfigyelhető vazokonstrikció legfőbb biomarkereként tartjuk számon.

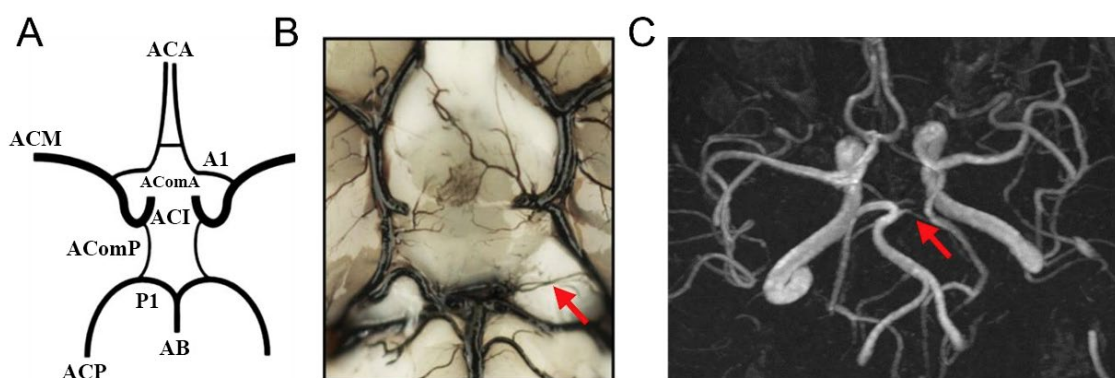


3. ábra A reperfüziós elégtelenség patomechanizmusai: Az elégtelen reperfüzió kialakulhat mikrovérröggképződés, periciták okozta kapilláris konstriktio, neutrofilek általi kapilláris eltömődés, nagy erek vazokonstriktioja és vérrög disztális embolizációja következtében. Az ábra El Amki és Wegener, 2021 alapján adaptált és módosított ábra.

1.4. A Willis-kör anatómiai varianciája

A zárt keringési rendszerrel rendelkező fajoknál a kollaterális keringés a nagyerek elzáródása esetén a vérellátás fenntartásához nélkülözhetetlen másodlagos tartalékot biztosít¹⁸. A Willis-kör képezi az alapját azoknak az elsődleges kollaterálisoknak, amelyek funkcionális anasztomózisokon keresztül átirányítják a perfúziót a rosszul perfundált területekre, például az iszkémiás régiókba. Az ezen elsődleges kollaterálisok hiányát vagy diszfunkcióját eredményező anatómiai eltérések különösen problematikusak lehetnek iszkémia során, amikor a helyi ATP- és glükózhiány súlyosbítja az AIS kimenetelét^{19, 20}. Az anatómiai varianciákat kapcsolatba hozták az AIS kialakulásának kockázatával és a stroke betegek rosszabb prognózisával. Egy tanulmány kimutatta, hogy az inkomplett Willis-kör esetén 47%-kal csökkent a stroke betegek kedvező kimenetelének valószínűsége²¹. Az arteria cerebri posterior (ACP) P1 szegmense nagyfokú anatómiai variabilitást mutat, hiszen a kísérleteinkben alkalmazott C57BL/6 törzs egereinél a populáció 80%-ban uni- és/vagy bilaterálisan hiányzik

vagy²² hipoplasztikus (csökevényes). Érdekes módon ez az anatómiai variancia a humán populáció mintegy 50%-ban is megfigyelhető²³. Az ACP P1 szegmens hipoplasztikusságát vagy hiányát nevezzük inkomplett Willis-körnek. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a P1 szegmens hiányának következtében súlyosabb lehet az AIS kimenetele az AIS egérmódeljében. A Willis-kör eltéréseinek ontogenetikai eredete az agyi érrendszer embrionális fejlődésére vezethető vissza²⁴. A posterior keringés anatómiai varianciája esetén, amely során a arteria basilaris (AB) és az arteria cerebri posterior (ACP) nem fuzionált teljesen a P1 szegmens hiányzik, vagy hipoplasztikus (4. ábra)²⁵.



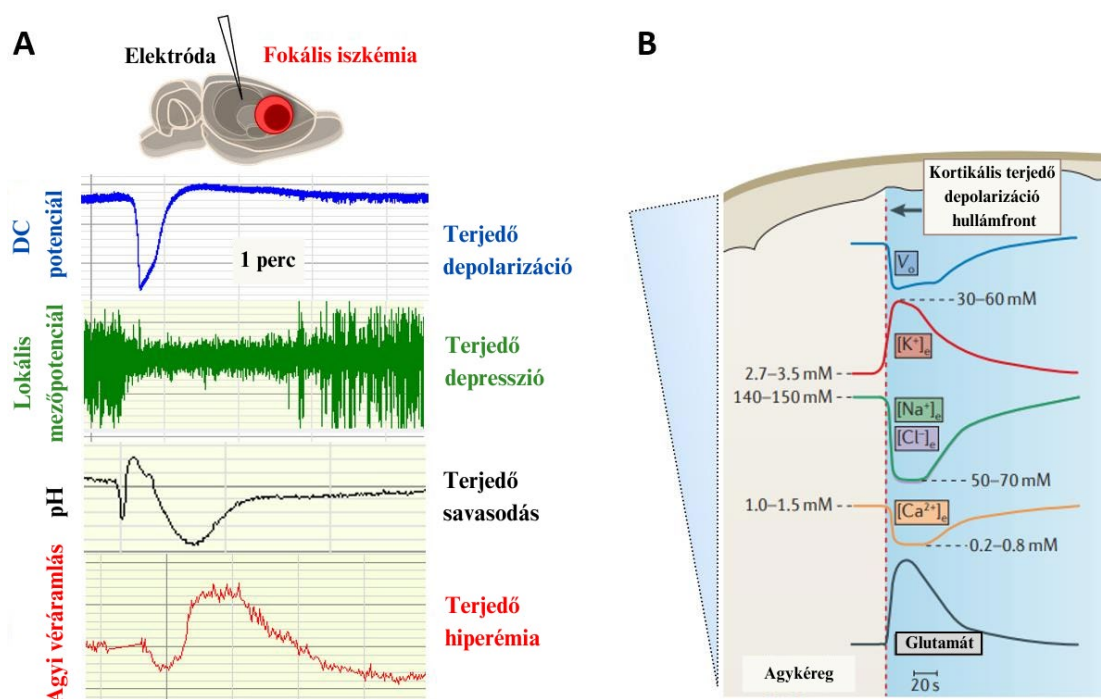
4. ábra A P1 szegmens hipopláziájának reprezentációja egerekben és emberekben. Sematikus ábrázolás a Willis-körrel. Rövidítések: ACA: arteria cerebri anterior, AComA: arteria communicans anterior (a két ACA-t összekötő rövid szakasz), A1: az ACA A1-es szegmense, ACI: arteria carotis interna, ACM: arteria cerebri media, ACP: arteria cerebri posterior, AComP: arteria communicans posterior, P1: az ACP P1 szegmense, AB: arteria basilaris (A). A bal oldali P1 szegmens hiánya a C57BL/6 egér agyában (B). A P1 hipopláziájának reprezentatív képkalkotó ábrázolása CT angiográfiával, amely az emberek Willis-körében körülbelül 50%-os valószínűséggel fordul elő. A piros nyilak jelzik a P1 szegmens hiányát vagy hipopláziáját (C). Az ábra Tanaka, 2006 és Hecht, 2012 alapján adaptált és módosított ábra.^{26, 27}

1.5. A terjedő depolarizáció (Spreading depolarization, SD)

Az AIS után megjelenő különböző típusú másodlagos patológiai mechanizmusok közül a terjedő depolarizáció (SD) lehet a legjelentősebb. Az SD a neuronok és gliasejtek lassan terjedő, masszív depolarizációs hulláma, amely 2-9 mm/perc sebességgel terjed az agyi szürkeállományban^{28, 29}. Az SD az érelzáródás kezdete után percekben belül bekövetkezik a szövetek ATP- és glükóztartalmának megvonása után⁶. Az agyi véráramlás megszűnése vagy drasztikus csökkenése oxigén- és glükóz deplécióval jár, ami viszont ATP-hiányhoz vezet. A Na/K-ATPáz ezt követő lebomlása az ATP-érzékeny káliumcsatornák nyitásával extracelluláris K⁺ felhalmozódáshoz vezet, ami 12 mmol/l feletti küszöbértéknél valószínűleg SD-t indukál³⁰.

Ugyanakkor az intracelluláris Na^+ emelkedés a neuronokban és az asztrocitákban ozmotikus vízbeáramlást okoz, ami citotoxikus ödémát eredményez. A túlzott intracelluláris Ca^{2+} túlságosan aktiválja az enzimatis és jelátviteli folyamatokat, ami károsodott neuronális működést vagy excitotoxikus sejthalált idéz elő⁶. Továbbá a kezdeti iszkémiás sérülést követően az oxigénhiány anaerob anyagcserét indukál, így laktát felhalmozódás révén intracelluláris acidózist hoz létre³¹. Az SD terjedése az extracellulárisan megemelkedett káliumion- és glutamát szinthez köthető. Az SD patofiziológiai relevanciája a citotoxikus ödéma kialakulásán, a glutamát felhalmozódáson és masszív savterhelésen alapszik, ami intracelluláris sejthalál kaszkádokhoz vezet³²⁻³⁴. Ahogyan az ismétlődő SD-k a penumbra felett terjednek, a penumbra irreverzibilisen károsodó iszkémiás infarktussá alakul át. A penumbrával ellentétben a core régió irreverzibilis károsodást szenved³⁵.

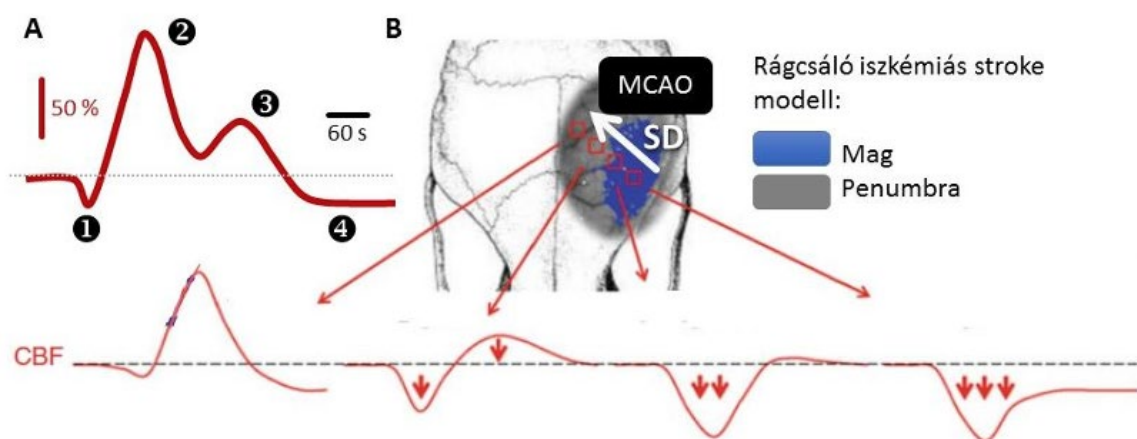
Az SD-t elektrofiziológiailag a direct current (DC) potenciál átmeneti negatív kitérése jellemzi az agykéreg spontán elektromos aktivitásának az electrocorticogram-nak (EcoG) a tranziens depressziója mellett. (5. ábra)



5. ábra Az SD hullámfront tipikus élettani paraméterei az optimálisan perfundált agykéregben. Az SD-t átmeneti negatív DC potenciál kitérése (kék) jelzi. A lokális mezőpotenciál oszcilláció amplitúdójának tranziens beszűkülése (zöld), amit terjedő depresszióknak nevezünk. A pH változásaként acidózis jön létre (fekete). Az SD-t hiperémia követi (piros), amely az SD hullámfrontjához képest rövid késéssel jelentkezik. A reprezentatív regisztrátumok ép keringésű agykéregből származnak. (A) Az extracelluláris tér ionjainak koncentrációváltozásai, amelyek az SD hullámfrontjához kapcsolódnak. Extracelluláris káliumion és glutamát felhalmozódás (piros és fekete vonal), és intracelluláris nátriumion, kalciumion és kloridion emelkedés figyelhető meg (B) (Prof. Dr. Farkas Eszter, Az

agykérgi terjedő depolarizáció kórélettani jelentősége, 2019, Pietrobon és Moskowitz 2014, módosítva)³⁶.

Az SD által okozott megemelkedett metabolikus igény kompenzálására az agyi keringés válaszol. A CBF válasz négy fázisát különböztetjük meg. Elsőként egy rövid hipoperfúziós szakasz indul az extracelluláris káliumion függvényében (6. ábra A, 1). Ezt egy magas hiperémia követ, ami az alapáramlást akár 200%-kal is meghaladhatja (6. ábra A, 2). Harmadik fázisként egy későbbi, azonban kisebb áramlaseselkedést figyelhetünk meg (6. ábra A, 3). Végezetül az áramlás egy harminc percnél tovább is elhúzódható, az alapvonal alá süllyedő oligémia követ (6. ábra A, 4). Ha a vazokonstriktió, tehát a hipoperfúziós fázis teret nyer a hiperémiás szakasz ellenében, terjedő iszkémiáról beszélünk. (6. ábra) (Prof. Dr. Farkas Eszter, Az agykérgi terjedő depolarizáció kórélettani jelentősége, 2019)

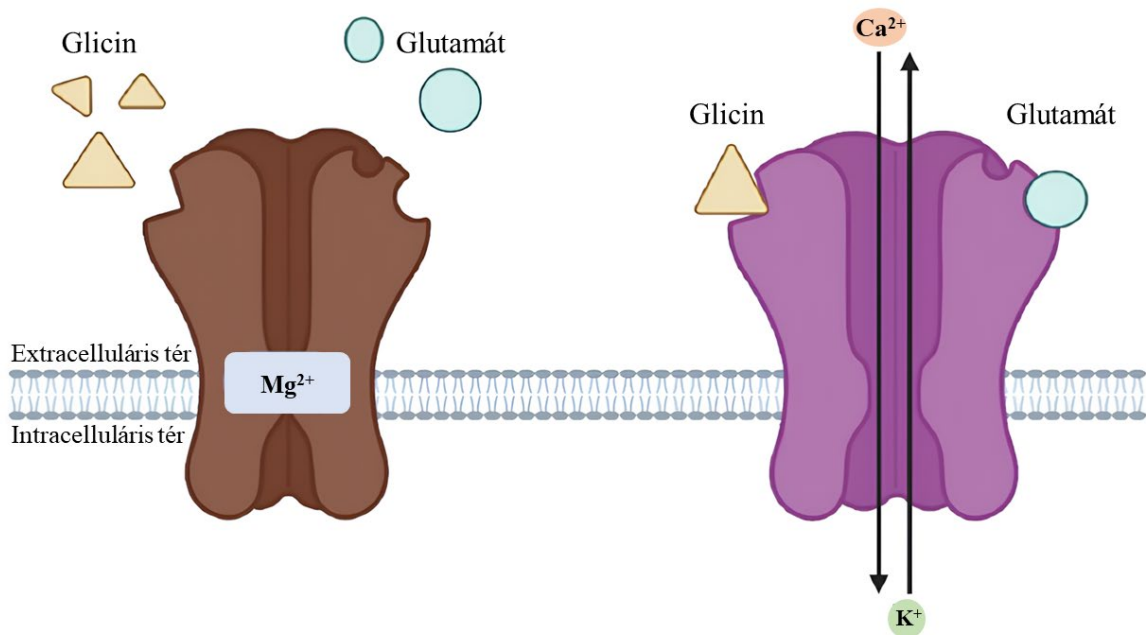


6. ábra A sematikus ábra az SD-re adott CBF válaszreakció szakaszait mutatja be. (A) Rövid hipoperfúzió (1), markáns hiperémia (2), kisebb hiperémia (3), hosszan elhúzódó oligémia (4). Rágcsáló iszkémiás stroke modelljében (ACM elzárás, middle cerebral artery occlusion, MCAO) az SD-re válaszul kialakult CBF változás folyamata az iszkémia terjedésének függvényében változik az agykéregben az infarktusos mag régióból kiindulva a penumbra felé haladva. (Hoffmann és Ayata 2013, Prof. Dr. Farkas Eszter, Az agykérgi terjedő depolarizáció kórélettani jelentősége, 2019)³⁷.

Az akut sérült humán kortexben specifikus SD mintákat társítanak a lézió képződéshez és a későbbi infarktusok kialakulásához^{22, 38, 39}. Ezek a jelentések és felhalmozódott kísérleti bizonyítékok együttesen tanúskodnak arról, hogy az SD-k spontán keletkeznek az akut agysérülés alatt elsődleges iszkémiás léziót okozva és felgyorsítva az infarktus méretének növekedését³⁵. Habár feltételezett kapcsolat az SD és az elégtelen reperfúzió között nem bizonyított.

1.6. Terápiás potenciál: SD gátlása

Az SD gyógyszerészeti célzása kihívást jelent. Kísérleti bizonyítékok arra utalnak, hogy az SD modulálható olyan gyógyszerekkel, amelyek hatással vannak az SD indukciójára és terjedésére⁴⁰. A potenciális célpontok széles skálája létezik, beleértve az ionforgalmat a Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} csatornákon és a Na^+/K^+ -ATP-pumpán keresztül, valamint a ligand alapú receptorantagonizmust, például az adrenerg, szerotonin, sigma-1, calcitonin génnel kapcsolatos peptid, gamma-aminovajsav (Gamma-aminobutyric acid, GABA_A) és glutamát receptorok⁴¹. A glutamát az egyik legfontosabb serkentő neurotranszmitter az emlősök központi idegrendszerében. A glutamát egy specifikus receptorhoz (Glutamátreceptor (GluR)) kötődve gerjesztő neurotransmissziót és intracelluláris jelátvitelt indukál. A GluR-t a neurotransmisszió sebessége és a jelátviteli mechanizmusok alapján ionotróp (iGluR) és metabotróp (mGluR) típusokba sorolják. Az iGluR-okat farmakológiailag további három altípusra osztják: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA), kainát és N-metil-D-aszpartát (NMDA)-receptorok (Hisashi Mori 2017, The NMDA Receptors). Az SD indukciója és terjedése ellen a leghatékonyabbnak bizonyult gyógyszerek az NMDA-receptorok antagonistái^{40, 41}. Az NMDA-receptorok transzmembrán ligandkapcsolt ioncsatornák, melyek teljes aktiválódásához az agonista (glutamát) és koagonista (glicin vagy D-szerin) kötődése, valamint a csatornát blokkoló Mg^{2+} blokk eltávolítása szükséges. Az aktivált NMDA-receptor közvetíti a Ca^{2+} beáramlást és a K^+ kiáramlást az ioncsatornán keresztül⁴² (7. ábra).



7. ábra Az NMDA-receptor sematikus ábrája. A bal oldalon a receptor inaktív, a neurotranszmitterek nincsenek megkötve, és a csatorna közepén lévő Mg^{2+} blokk lezárja az ionutat. A jobb oldalon a neurotranszmitterek (glicin és glutamát) aktiválják a receptort, a Mg^{2+} blokk eltűnik és az ionok át tudnak haladni a csatornán.

Amikor az agyban SD alakul ki, a K^{+} nagymértékű hulláma halmozódik fel az extracelluláris térben, és gyorsan kiváltja a közeli neuronok és gliasejtek depolarizációját³⁶. Ezt követően koncentrációgradiensük mentén Na^{+} és Ca^{2+} jut be a sejtekbe, amit nettó vízbeáramlás és sejtduzzadás követ^{6, 36}. Ugyanakkor a Ca^{2+} terhelésre válaszul elsősorban glutamát, de más neurotranszmitterek is felszabadulnak a szinaptikus részbe³⁶. Az NMDA-receptorok túlműködése az akut agysérülés esetén a későbbi SD-k során az úgynevezett excitotoxicitás folyamatát idézi elő, amely tömeges celluláris Ca^{2+} túlterhelést és a halálzási kaszkádok aktiválódását eredményezi³³.

Az NMDA-receptor kompetitív és nem kompetitív antagonizmusa egyaránt hatékonyan tűnik az SD terjedésének elnyomására^{41, 43}. Kísérletileg már nagyszámú kis molekulájú NMDA-receptor-gátlót teszteltek, például PCP, MK801, ketamin, Mg^{2+} , Zn^{2+} . Ezeknek a blokkoló anyagoknak a klinikumba való átültetését azonban erősen korlátozzák a széles körben elterjedt mellékhatásaik. Valószínűleg a preklinikai állatmodellekben az SD elnyomására leggyakrabban használt gyógyszer az MK801, amely egy nem kompetitív NMDA-receptor-antagonista. Már az AIS-t követő infarktushoz kapcsolatos korai vizsgálatok is azt mutatták, hogy az MK801 neuroprotektív hatást fejt ki az SD-k részleges vagy teljes blokkolásával⁴⁴. Mások arról számoltak be, hogy az MK801 csökkenti a Ca^{2+} beáramlást nagy érelzáródást követően rácsáló modellekben⁴⁵. Az MK801 esetében a hatásmechanizmus a hatóanyagnak az NMDA-receptor

transzmembrán doménjének közepébe való irreverzibilis kötődése (a Mg^{2+} blokk helyén). Az MK801 klinikumba való átültetésének korlátja a gyógyszer ambivalens hatása volt, mivel míg a jól ellátott szövetekben hatékonyan megszüntette az SD-t⁴⁶, addig az MK801 súlyosan iszkémiás vagy hipoxiás szövetekben teljesen hatástalan volt az SD ellen^{47, 48}.

Az egyetlen klinikailag hatékony NMDA-blokkoló az SD-k esetében a ketamin⁴⁹. A ketamin egy nem kompetitív NMDA-gátló, amely a receptort nyílt csatornablokkoló mechanizmus révén antagonizálja. A ketamin erőteljes hatását több klinikai vizsgálatban is kimutatták, ahol a gyógyszer képes volt csökkenteni az SD-klasztereket és az SD-k teljes számát traumás agysérülésnél és szubarachnoidális vérzésnél az AIS után kis betegcsoportokban⁴⁹⁻⁵¹.

2. CÉLKITŰZÉS

Hipotéziseink bizonyítása érdekében azt kívántuk megerősíteni, hogy:

- I. Az SD kialakulása és az azt követő elégtelen reperfúzió a Willis-kör elsődleges kollateralizáció hiányával áll kapcsolatban az egér AIS modellben
- II. Az SD farmakológiai blokkolása mérsékeli az elégtelen reperfúziót az egér AIS modellben

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

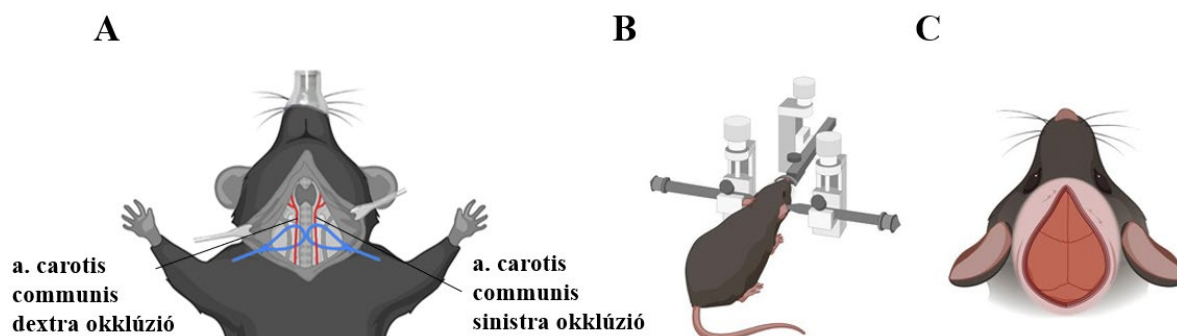
3.1. Állatok

A kísérleti eljárásokat a magyarországi Csongrád-Csanád megyei Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte. Az eljárásokat a Magyar Tudományos Akadémia Állatkísérleti Tudományos Bizottságának irányelvei szerint végeztük: [az aktualizált állatvédelmi törvény és rendeletek: 40/2013. (II. 14.) Magyarország Kormánya], a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai uniós irányelveknek, és az ARRIVE iránymutatásoknak megfelelően. Az egereket, amelyeket az Európai Unió Kiválósági Központjának Biológiai Kutatóközpontjában (Szeged, Magyarország) található Charles River telepről szereztünk be, csoportos elhelyezésben, normál 12 órás világos/sötét ciklusban tartották és ad libitum kaptak élelmet és csapvizet.

3.2. Műtéti beavatkozások

Kísérleteink során 10-12 hetes hím (n=28) és nőstény (n=29) C57BL/6 egereket (m=25-31g) izofluránnal (0,6-0,9% N₂O:O₂ – 2:1) altattunk egy, az erre a célra kialakított altató dobozban, majd a műtéti asztalon hagytuk őket spontán lélegezni nazális maszkon keresztül. A testhőmérsékletet 37°C-on tartottuk rektális hőmérővel összekötött termosztát-kontrollált fűtőpárnával (CODA monitor, Kent Scientific Corp., Torrington, CT, USA). A szemüket dexpanthenol tartalmú Corneregel szemgéllel (Dr. Gerhard Mann - Chemisch-pharmazeutische fabrik) vontuk be, hogy óvjuk azokat a kiszáradástól. Topikális Lidokaint (1%) adtunk minden bemetszést megelőzően. Az állatok nyakán egy középvonali bemetszést követően mindkét oldali arteria carotis communis-t gondosan elszeparáltuk az azokat körülvevő szöveti struktúráktól és a nervus vagus-tól, majd selyemszálakkal (Item number: 18020-60, Fine Science Tools, Foster City, CA 94404-4824, USA) aláhurkoltuk azokat a későbbi okklúzió végett. Ezután az egereket rögzítettük hason fekvő helyzetbe egy sztereotaxiás készülékbe a hallójáratba ékelt stabilizáló szerkezettel, hogy a beavatkozás alatt mozdulatlanok maradjanak a pontos és precíz monitorozás miatt. Ezalatt továbbra is spontán lélegeztek az állatok az altató maszkon keresztül. Egy középvonali (sagittalis) bemetszést ejtettünk a nyílvarrat felett és a bőrt finoman elhúztuk oldalra és selyemszálakkal rögzítettük. A korábban feltárt régiót sóoldat és pamut vatta segítségével megtisztítottuk a maradék szőrzettől és szöveti folyadéktól. Ezután a koponyát egy UV fényre polimerizálódó gyantával (UV683 Light Curing Adhesive, Permabond Ltd., Wessex, UK) vontuk be, hogy növeljük az átlátszóságát és elkerüljük a kiszáradást. A 15

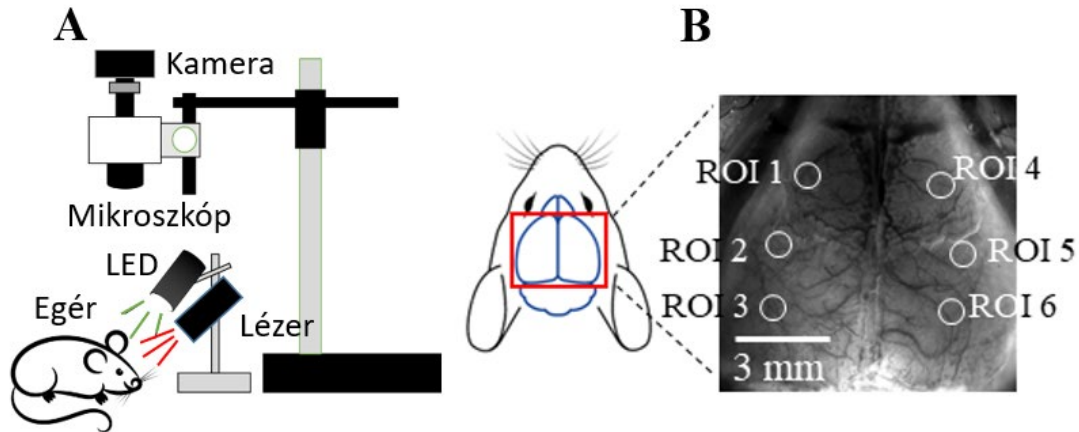
perces UV lámpa alatti polimerizáció után a koponya transzparenssé vált, ami által tisztább képeket kaphattunk az agy felületéről az intrakraniális nyomás megzavarása nélkül (8. ábra).



8. ábra Reprezentatív képek az előkészületekről a 2-vessel occlusion (2VO) modellhez. AIS indukciója. Selyemszálakkal körbehurkolva az arteria carotis communisok a későbbi 2 VO-hoz (A). Az egér hason fekvő helyzetben rögzítve a sztereotaktikus keretben (B). A transzkraniális képelkötés céljából egy középső bevágást ejtettünk a sagittális varrat felett és a fejbőrt finoman oldalra húztuk (C).

3.3. Transzkraniális zöld fény reflektancia (Intrinsic Optical signal, IOS) képkeltetés és lézer folt kontraszt analízis (Laser Speckle Contrast Analysis, LASCA)

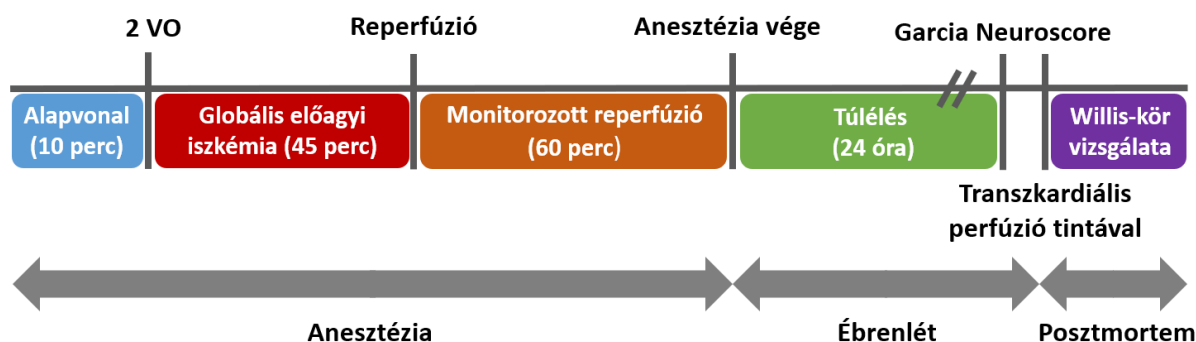
A protokoll időtartama alatt szöveti zöld fény reflektanciát (IOS) és Lézer Speckle Kontraszt Analízissel (LASCA) agyi vérátáramlást rögzítettünk 1 Hz mintavételi frekvencián. Mivel a terjedő depolarizációk intenzív celluláris térfogatbeli változásokat (extra > intracelluláris víz transzlokáció) okoznak az agykéregben, az SD hullámfrontja markáns zöld fény reflektancia fokozódással jár, melynek amplitúdója és hossza jól mérhető. A teljes kortikális felületet megvilágítottuk LED- (530 nm peak wavelength; SLS-0304-A, Mightex Systems, Pleasanton, CA, USA), illetve lézer diódával (HL6545MG, Thorlabs Inc., New Jersey, USA; 120 mW; 660 nm emission wavelength) tápegységgel (LDTC0520, Wavelength Electronics, Inc., Bozeman, USA) működtetve 160mA-ra állítva. Mindkét képsorozatot monokróm CCD kamerával (resolution: 1024 x 1024 pixel, Pantera 1M30, DALSA, Grobenzell, Germany) rögzítettük, ami a sztereomikroszkópra (MZ12.5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) volt applikálva. A LED (100ms/s) és lézer (2ms/s) megvilágítások és kamera expozíciós időket (100ms/s LED és lézer esetén) az ehhez készült LabVIEW programban szinkronizáltuk. A háttérképek ugyanezzel a kamerával lettek rögzítve 1 frame/s rátával, hogy az offline korrekciónál használni tudjuk azokat a nyersképekhez (9. ábra).



9. ábra Nem invazív, transzkraniális IOS és LASCA képalkotás. A kísérleti képalkotó rendszer elrendezése (A). Reprezentatív transzkraniális IOS kép az egéragy kortexéről a számunkra érdekes régiók offline elhelyezésével (Region of interest, ROI-k 1-6) (B).

3.4. Kísérleti protokoll és műtét utáni ápolás

A multimodális képalkotás összesen 115 percig tartott zöld fény reflektancia és lézer speckle kontraszt analízissel. Mérési protokollunkban 10 perc alapvonal felvétele után a selyemszálak elhúzásával bilaterálisan okkludáltuk az arteria carotis communisokat (ACC 2VO), ezzel tranziens globális előagyi iszkémiát indukálva. 45 perc elteltével az okklúziót feloldottuk, majd még 60 percen át monitoroztuk a reperfüziót. A megszilárdult gyantát óvatosan eltávolítottuk a koponya felületéről, a sebeket bevarrtuk, lidokainnal (10 mg/ml, Eagis) és Betadinnal (10 mg/ml, Eagis) kezeltük a dezinfekció és fájdalomcsillapítás céljából, az anesztéziát termináltuk és az állatokat 32 °C fokos inkubátorba (1 egér/ketrec) 2 órán át ébresztettük. Hogy a kiszáradást megelőzzük, az állatokat egy előmelegített (37 °C fokos) 0,9%-os fiziológias sóoldattal (1 ml) hidratáltuk szubkután. Hosszú távú fájdalomcsillapítás érdekében az egereknek bőre alá Carprofent (5 mg/kg; (5 mg/kg; Rycarfa, 8501 Novo Mesto, Slovenia) injektáltunk, amely egy nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer. Az állatok friss vizet és puhított ételt kaptak 24 órán át. A túléltetés után 24 órával az egerek szenzomotoros funkcióit értékeltük Composite Garcia Neuroscore (GN) skálával, majd transzkardiális prefüziót hajtottunk végre rajtuk fekete tintával a Willis-kör vizsgálata érdekében. (10. ábra).



10. ábra A kísérleti protokollunk. 10 perc alapvonal felvétele után Globális előagyi iszkeániát indukáltunk bilaterális arteria carotis communis (ACC) okklúzióval 45 percig, majd a reperfúzió után további 60 percig felvételeztünk. Az állatok 24 óra túlétetése után a szenzimotoros funkciókat Composite Garcia Neuroscore (GN) skálával értékeltük, majd ezt követően transzkardiálisan perfundáltuk fekete tintával a Willis kör és az agyi erek jelöléséhez.

3.5. SD farmakológiai blokkolása

Az SD-k gyakoriságát a nem-kompetitív NMDA receptor antagonist MK801 adminisztrációjával csökkentettük intraperitoneálisan adva 30 perccel az iszkémia indukcióját megelőzően. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 0,3 mg/kg) A kontroll csoport az MK801 oldószerét, fiziológiás sóoldatot kapott.

3.6. Átlagos artériás vérnyomás invazív mérése (Invasive mean arterial blood pressure, MABP)

Hím és nőstény C57BL/6 egereket (Kontroll n=5, MK801 n=5) izofluránnal altattunk (0,6-0,9 %), majd invazív vérnyomásmérés és vérgáz analízis céljából a bal arteria femoralis-ba katétert (Mouse 32G Femoral artery catheter, WPI, 175 Sarasota Center, USA) helyeztünk. A szisztémás vérgáz analízist 20 perccel a monitorozás előtt végeztük el. Az MABP jel digitalizálása egy erre a célra kifejlesztett hardver és szoftver program (Biopac MP150 and Acknowledge 4.2, Biopac Systems Inc., USA) segítségével történt. A fiziológiai változók (MABP, O₂, CO₂, pH és az artériás parciális nyomás) a fiziológiai tartományban voltak.

3.7. Stroke utáni neurológiai deficit értékelése

A szenzimotoros funkciók értékelése a Composite Garcia Neuroscore (GN) skálával történt. A GN összpontszám tartománya a 0 (súlyos károsodás) és a 21 (nincs károsodás) értékek között mozog. Az értékelés 7 fázisból áll, sorrendben a következők: spontán aktivitás, egér oldalának érintése, egér bajuszának érintése, végtagok szimmetriája, oldalirányú elfordulás, mellső

végtaggal járás és mászás. A spontán aktivitásnál azt figyeljük, hogy az állat 5 perc alatt hány falat tud érinteni az erre a célra készített ládában, vagy egyáltalán megmozdul-e. Az oldal simítás és a bajusz érintés esetén azt néztük, hogy az egér mindkét oldalán érzékeny-e, vagy valamelyik oldala, esetleg mindkettő, érzéketlen. A végtagok szimmetriája azt mutatja meg, hogy a mellső és hátsó végtagok milyen mértékben térnek el vagy egyeznek meg a mozgásuk, kinyújtásuk tekintetében. Az oldalirányú forgás vizsgálatakor azt figyeltük, fordul-e az állat (csak az egyik irányban, vagy mindkét irányban) és ha igen, mekkora mértékben (kevesebb vagy több, mint 45 °C). A mellső végtaggal járás vizsgálata során a mellső végtagok mozgásának szimmetriáját, mozgásának irányát, esetleges hemiplégiáját pontoztuk. Mászásnál pedig az állat sebességét és képességét pontoztuk az emelkedőn való felmászás során. A neurológiai pontozást egy nappal a stroke indukciója előtt és 24 órával utána hajtottuk vége (10. ábra). Minden vizsgálati lépés minden egyes állatnál azonos sorrendben és feltételek mellett történt, és különböző személyeket vontunk be a végrehajtásukba.

3.8. A Willis-kör anatómiai jellemzése

A Willis-kör anatómiai jellemzéséhez az egereket transzkardiálisan perfundáltuk mély altatás alatt 20 ml 0,9% NaCl és 20 ml 4% paraformaldehid (PFA) oldattal, majd a perfúziót követően 5 ml fekete, szén alapú tintát (Drawing Ink-Tus, KOH-I-NOOR HARDTMUTH, 371 30 Ceske Budejovice, Czech Republic) juttattunk az egerek keringésébe. A dekapitációt követően az agyakat óvatosan eltávolítottuk és a Willis-kört Nikon-DS Fi3 kamerával felszerelt fénymikroszkóp (Alpha STO-4M, Elektro-Optika Kft., 030 Érd, Kaktusz utca 22, Hungary) alatt vizsgáltuk. Az analízishez szükséges fotók elkészítését követően az agyakat 4%-os PFA-ba helyeztük, és 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.9. Hematoxillin- eozin (HE) festés a sejtsérülések megfigyeléséhez

Az iszkémia következtében kialakult neuronális nekrozist hematoxillin-eozin festéssel tettük láthatóvá. A kontroll (n=10) és MK801-el kezelt (n=10) agyakból 10 µm vastag koronális metszeteket készítettünk kriosztáttal (Leica CM 1860 UV, Leica, Germany). A metszeteket először hematoxillinnal (Sigma-Aldrich, USA) festettük meg 25 másodpercen keresztül, majd a két, 3 perces vizes és egy 3 perces desztillált vizes öblítés után eozinban (Sigma-Aldrich, USA) inkubáltuk 15 másodpercig. Ezt egy dupla desztillált vizes öblítés követte, majd dehidratáció etanollal. Legvégül az agyszeleteket kétszer átmostuk xilollal, majd végül Eukit-tel (Merck, USA) fedtük le. A szeletekről mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH,

Germany) 40X-es nagyításon felvételeket készítettünk Nikon-DS Fi3 kamera segítségével, majd ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) programmal felmértük a sejtpusztulás mértékét kérgi, hipokampális és striatális területeken.

3.10. Adatok analízisa és statisztika

A teljesítmény analízis a farmakológiai kísérletek végrehajtásához meghatározott elvek alapján történt. A pilot kísérleteink a kísérleti csoportok (MK801 vs. Kontroll) között elérték a konfidenciaszintet, 95%-os eredményt és 80%-os teljesítményt értünk el alacsony mintaszám mellett ($\alpha = 0.05$ és β (típus II hiba) 0.2). Ahogy számítottuk, elegendő statisztikai adatot feltételeztünk a 11-12 állat/csoport végső mintanagyság mellett. A kalkulációkat a GPower 3.1 (Heinrich Heine University of Düsseldorf, Germany) programban futtattuk le. Minden egeret kezeléstől és nemtől függetlenül kódoltunk, és véletlenszerűen osztottunk be a kísérleti csoportokba. A műtéteket, a neurológiai vizsgálatokat, a reperfúzió hatékonyságát és az infarktus méretének kiszámítását végző négy vizsgáló teljesen „vak” volt a kezelés és az állatok neme tekintetében. Hat állatot kizártunk, mivel elpusztultak az iszkémiás sérülés következtében vagy a felvételezés ($n=2$) vagy az első éjszaka alatt ($n=4$). A képeket és a felvételeket az ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) és AcqKnowledge 4.2.0 (Biopac Systems Inc., USA) programokkal analizáltuk. Az IOS intenzitás és CBF időbeli helyi változásainak kiszámításához érdeklődési pontokat (Regions of interest, ROIs, 50×50 pixelek, $0,4 \times 0,4$ mm) helyeztünk el a képeken. A LASCA által kapott CBF görbék az alapvonal első 5 percének átlagos CBF-je (100%) és az egyes kísérletek befejezése után rögzített biológiai nulla (0%) felhasználásával fejeztük ki. A neuronális nekrozist az ImageJ program beépített automatizált analyze particles plug-in-jével értékeltük. Az eredményeket átlagolva, szórással együtt adtuk meg. Minden adatot először a Shapiro-Wilk-féle normalitási teszten átfuttattunk, amely alapján eldöntöttük, parametrikus vagy nem parametrikus statisztikát válasszunk. A statisztikai elemzést és a diagrammok készítését a SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) szoftverrel végeztük. A különböző statisztikai módszereket az egyes ábrák részletesen ismertetik.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

4.1. Az átlagos artériás vérnyomás (Mean arterial blood pressure, MABP) és az artériás vérgázok kiértékelése

A vérmintákat (100 µl) 20 perccel a mérés (alapvonal) kezdete előtt vettük le. Minden szisztémás változó a fiziológiás tartományon belül maradt (11. ábra). Az MK-801-es kezelés sem a nem dimorfizmus esetén, sem a teljes mérés során nem volt szignifikáns hatással a MABP-re (12. ábra).

Csoport	n	Súly (g)	MABP Alapvonal (Hgmm)	MABP 1 perccel az MK801 vagy az oldószeres injekció után (Hgmm)	MABP 1 perccel a 2 VO indukciója után (Hgmm)	MABP 1 perccel a reperfúzió előtt (Hgmm)	MABP 15 perccel a reperfúzió után (Hgmm)
Kontroll	5	27±4,1	86±11	84±7,0	105±2,0	77±7,0	82±5,0
MK801	7	26±4,9	85±7,0	85±5,0	104±14	79±9,0	80±7,0

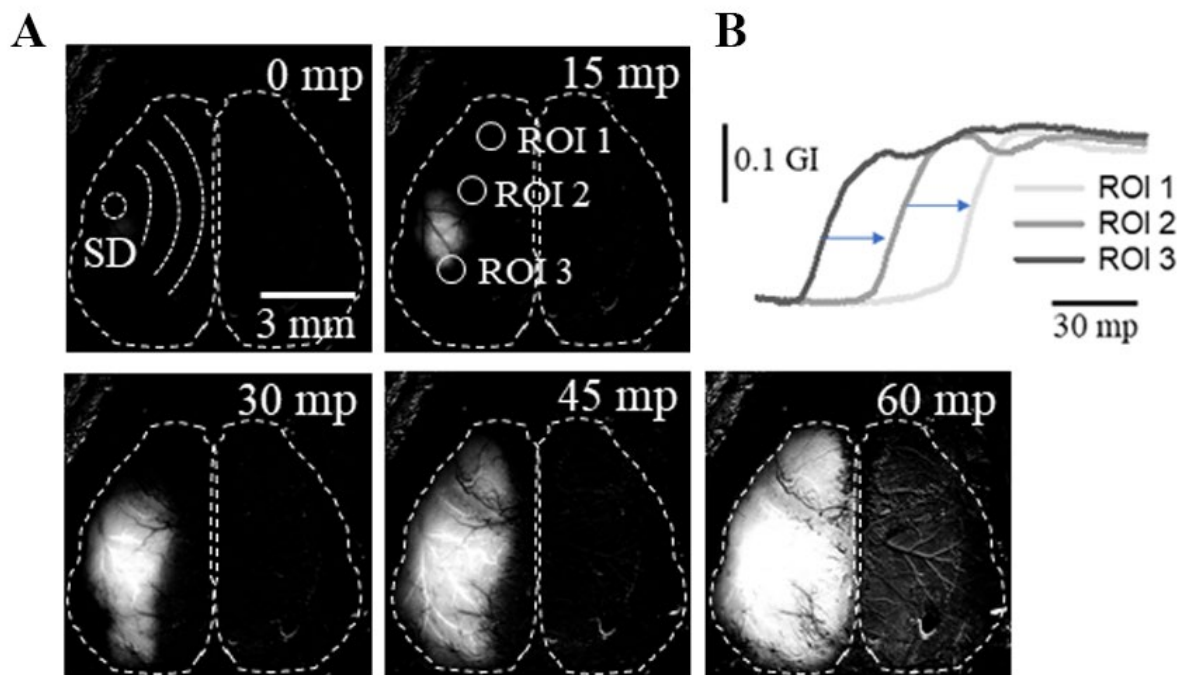
11. ábra A kísérleti csoport MABP változásai az adatok monitorozása során.

Csoport	pH	pCO ₂ (Hgmm)	pO ₂ (Hgmm)
Kontroll	7,4±0,5	29±6,0	148±17
MK801	7,4±0,3	28±9,0	132±13

12. ábra Artériás vér pH, parciális CO₂ (Hgmm) és O₂ (Hgmm) nyomás az adatok monitorozása előtt.

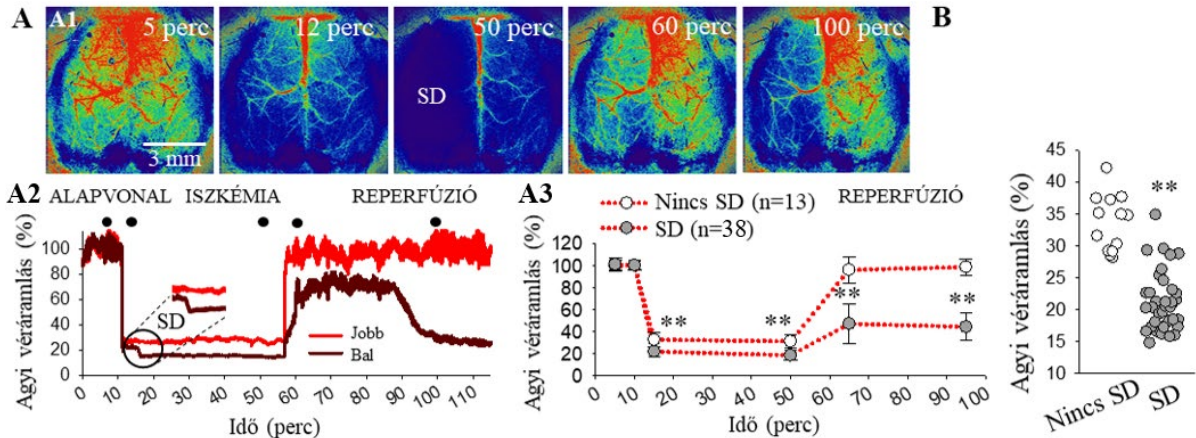
4.2. Térbeli egybeesés az iszkémia alatti SD és a későbbi elégtelen reperfúzió között

Az iszkémia indukciója alatt a koponyán keresztül végzett IOS képalkotás lehetővé tette az SD megjelenésének és terjedésének nyomon követését az egér agykérgén (13. ábra).



13. ábra Az agykérgi felszín reprezentatív IOS képsorozata a háttér kivonása után (A) és a megfelelő IOS intenzitási görbék (B) az SD egyoldali (unilaterális) előfordulását mutatják.

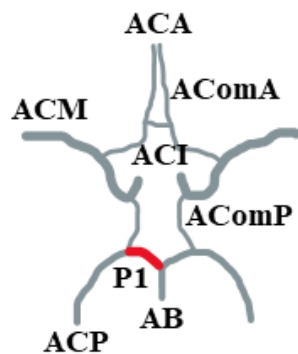
Három különböző SD mintázatot figyeltünk meg: (i) az SD mindkét hemiszfériumon kialakult, ezt **bilaterális SD**-nek neveztük el (bilaterális SD, $n=9/6$, hím/nőstény, a két SD a két féltekén független fókuszokban alakult ki, és időben is elváltak egymástól), (ii) az SD-k túlnyomórészt az egyik féltekén jelentkeztek, ezek az **unilaterális SD** nevet kapták (unilaterális SD, $n=4/3$, hím/nőstény), vagy (iii) nem láttunk SD-t egyik agyféltekén sem, ezek az egerek **no SD** csoport lettek (no SD, $n=0/3$, hím/nőstény). Összesen 37 SD-t rögzítettünk 25 egerben. Az SD-k nagyobb valószínűséggel fordultak elő a hímekben, mint a nőstényekben (az SD kialakulásában érintett agyféltekék: $n=22/15$, hím/nőstény). A CBF képalkotás egy éles esést jelzett az agyi áramlásban iszkémia alatt (14. ábra (A)). A markánsabb perfúziós csökkenés kedvezett az SD megjelenésének (CBF esés $21,1 \pm 4,6$ vs. $33,6 \pm 4,4\%$, SD vs. no SD) (14. ábra (B)). Az SD előfordulásához további áramláscsökkenés, úgynevezett terjedő iszkémia is társult ($18,6 \pm 4,3$ vs. $31,2 \pm 6,3\%$, SD vs. no SD) (14. ábra (A)). Az arteria carotis communis-ok visszaengedését követően elégtelen reperfúziót észleltünk abban a hemiszfériumban, ahol az SD kialakult ($47,2 \pm 18,3$ és $44,4 \pm 12,5\%$, 15 és 45 perccel a reperfúzió indítása után). Ezzel ellentétben, az SD-vel nem érintett féltekén a perfúzió visszaállt az iszkémiát megelőző szintre ($96,3 \pm 11,9$ és $98,9 \pm 7,4\%$, 15 és 45 perccel a reperfúzió indítása után) (14. ábra (A)).



14. ábra (A) A reprezentatív CBF képek (A1) térbeli egybeesést mutat az iszkémia során fellépő SD és a későbbi elégtelen reperfúzió jelensége között (A2). A CBF képek időben megfelelnek az agyi véráramlás görbék feletti teli köröknek. Az átlagolt CBF értékek (A3) elégtelen reperfúziót mutatnak ipsilaterálisan az iszkémiás SD kialakulásával 15 és 45 perccel a carotisok felszabadítása után. Ezzel szemben teljes reperfúziót láthatunk az SD nélküli iszkémiás hemiszfériumon (B). Az SD előfordulása az iszkémia kezdetét követő nagyobb CBF csökkenéshez kapcsolódott. Az adatok egyedi értékek (B), átlag stdev (A3). Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel értékeltük (A2: $p = 0,065$, B: $p < 0,050$), majd egyirányú RM ANOVA-t végeztünk Holm-Sidak post-hoc teszttel (A3) és Mann-Whitney Rank Sum tesztet (B), $p < 0,01^{**}$.

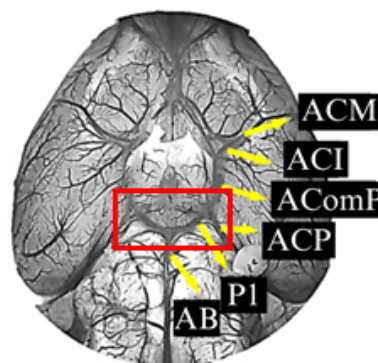
4.3. Az SD kialakulásának kedvező inkomplett Willis-kör és a nagyobb CBF csökkenés közötti kapcsolat

A Willis-kör anatómiailag gyakran hiányos a fiatal felnőtt C57BL/6 egerekben⁶³, ami azt jelenti, hogy az arteria cerebri posterior P1 szegmense hiányzik vagy diszpláziás, tehát rendellenes fejlődésű²⁷. Ennek megfelelően a P1 szegmens hiánya a mi C57BL/6 egér populációinkban is gyakran megfigyelhető volt (15. ábra).



Komplett Willis-kör:

- P1 bilaterális megléte

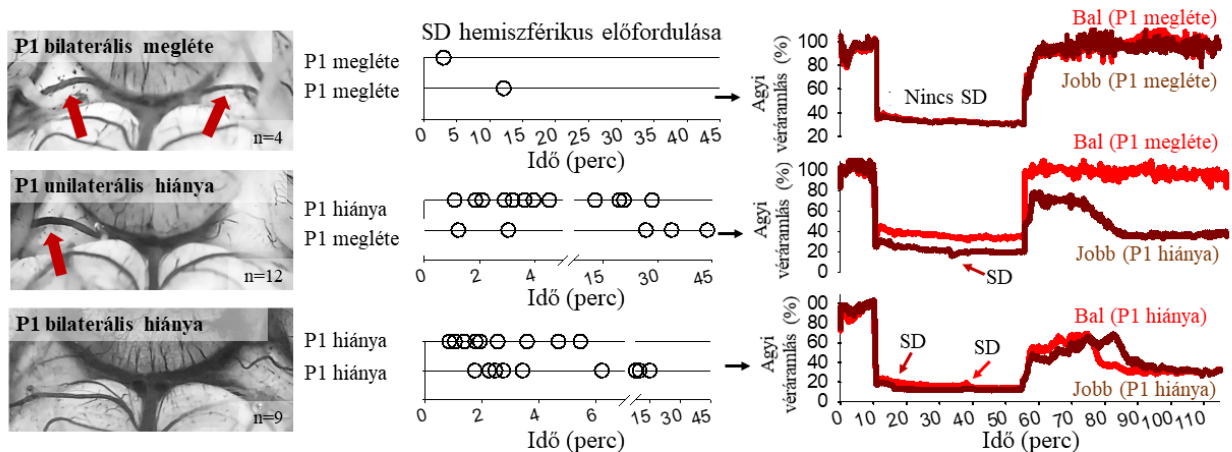


Inkomplett Willis-kör:

- P1 unilaterális hiánya
- P1 bilaterális hiánya

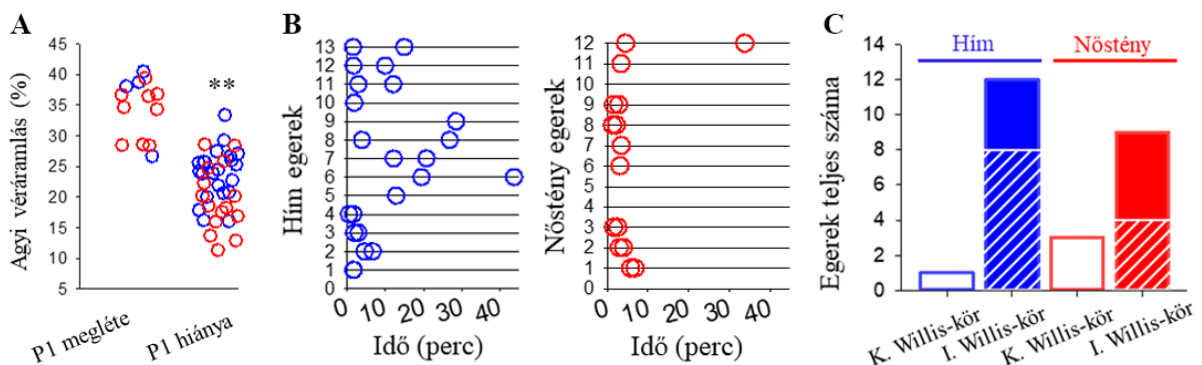
15. ábra A Willis-kör anatómiája sematikusán ábrázolva (P1 szegmens piros színnel) és egy egér agyalapról készült eredeti fotómikroszkópos felvétel, az érrendszer szénfestéssel jelölve. ACA: arteria cerebri anterior ACoMA: arteria communicans anterior; AB: arteria basilaris; ACI: arteria carotis interna; ACM: arteria cerebri media; ACoMP: arteria communicans posterior.

Fontos megjegyezni, hogy a P1 szegmens hiánya az ipsilaterális hemiszfériumban nagyobb perfúziós esést eredményezett ($21,3 \pm 5,0$ vs. $30,8 \pm 6,3\%$, P1 hiánya vs. P1 megléte), ami általában egybeesett az SD megjelenésével, és a későbbi elégtelen reperfúzió kialakulásával. A P1 szegmens jelenléte több esetben volt megfigyelhető nőstény egerek esetén, mint hímekben. Ezen szegmens bilaterális megléte 4 egérben volt látható ($n=1/3$, hím/nőstény), ahol összesen csak két SD-t detektáltunk. Az unilaterális P1 hiány 12 egérben volt megfigyelhető ($n=8/4$, hím/nőstény) és ezen esetekben az ipsilaterális hemiszfériumon jelentek meg az SD-k. Néhány egérben ($n=4/1$, hím/nőstény) SD alakult ki a kontralaterális oldalon is abban az esetben, amikor az agyi véráramlás az ellentétes kortextben az SD küszöb értéke alá zuhant. Végezetül a P1 szegmens bilaterális hiánya esetén 9 egérben ($n=4/5$, hím/nőstény) mindkét hemiszfériumban SD-t regisztráltunk (16. ábra).



16. ábra A Willis-kör ACP P1 szegmensének hiánya előre jelzi az ACC okklúziójára és az azt követő SD-k megjelenésére válaszul kialakuló nagyobb perfúzió csökkenést. A mikroszkópos felvételek a Willis-kör anatómiai változatait mutatják. A piros nyilak a P1 szegmenst jelölik. A képeknek megfelelő idővonalak a 45 perces iszkémia során észlelt SD-k időbeli mintázatát ábrázolják az összes egeret tekintve. A reprezentatív agyi véráramlás görbék a P1 jelenlétének/hiányának megfelelő reperfúziós kinetikát ábrázolják. Megjegyzés: az iszkémia és az elégtelen reperfúzió alatti SD-k leggyakrabban a P1 hiányával ipsilaterális féltekén alakultak ki.

A P1 szegmenst gyakrabban láttuk nőstény egerekben (17. ábra (A)). A nőstény egerekben kevesebbszer megjelenő SD (17. ábra (B)) a gyakrabban előforduló komplett Willis-körrel magyarázható (komplett Willis-kör: 4/12 vs. 1/13, nőstény vs. hím) (17. ábra (C)).

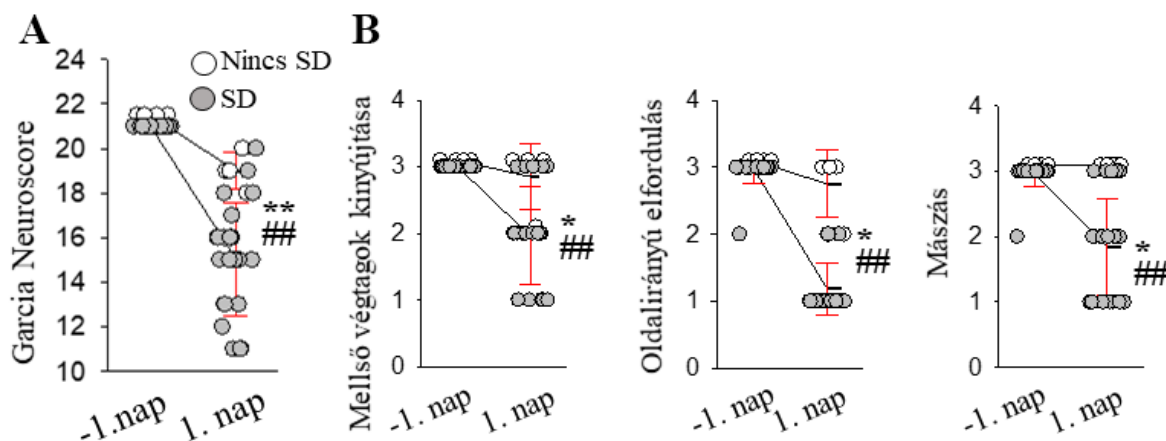


17. ábra Az agyi véráramlás minimumát röviddel az iszkémia indukciója után mértük az egyes féltekékben P1 szegmens meglétében vagy hiányában. Megfigyelhető, hogy a P1 hiánya alacsonyabb agyi véráramlás minimummal jár (kék: hím, piros: nőstény) (A). Az első SD-k időbeli mintázata féltekénként az iszkémiás időszak alatt (45 perc) hím (n=13) és nőstény (n=12) egerekben (B). A P1 szegmens anatómiai variációjának előfordulása nőstény és hím egerekben. A komplett Willis-kör üres, az unilaterálisan inkomplett szaggatott vonalakkal, míg a bilaterális hiány telt oszlopdiagram sávokkal ábrázolva (C). Az adatok eloszlását (A panel) Shapiro-Wilk teszttel értékeltük ($p = 0,483$), majd egyirányú ANOVA-t végeztünk Holm-Sidak post-hoc teszttel, $p < 0,01^{**}$.

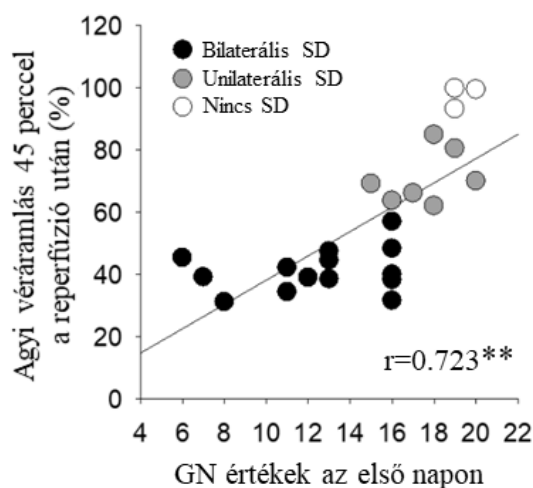
4.4. A neuronális sérülés az elégtelen reperfúciónak köszönhető

Az SD-t és az elégtelen reperfúziót elszenvedett egerek jelentősebb szomatosenzoros neurológiai deficitet mutattak, amit GN skálán értékeltünk egy nappal az iszkémia indukciója

után ($14,5 \pm 3,1$ vs. $18,8 \pm 0,8$, SD vs. no SD) (18. ábra (A)). A mellső végtagok kinyújtása, oldalra fordulás és mászás összefüggésbe hozható az SD kialakulásával, és a reperfúziós elégtelenség bekövetkezésével (18. ábra (B)). Ezzel szemben, az SD-t el nem szenvedett egereknél, akiknél a reperfúzió is elégséges volt, közel ugyanúgy teljesítettek, mint az iszkémia előtti optimális funkcionális állapotukban ($18,8 \pm 0,8$ vs. $21,0$, iszkémia után vs. iszkémia előtt) (18. ábra (A)). Továbbá, a magasabb GN pontszám szorosan korrelál a reperfúzió magasabb szintjével (18. ábra).

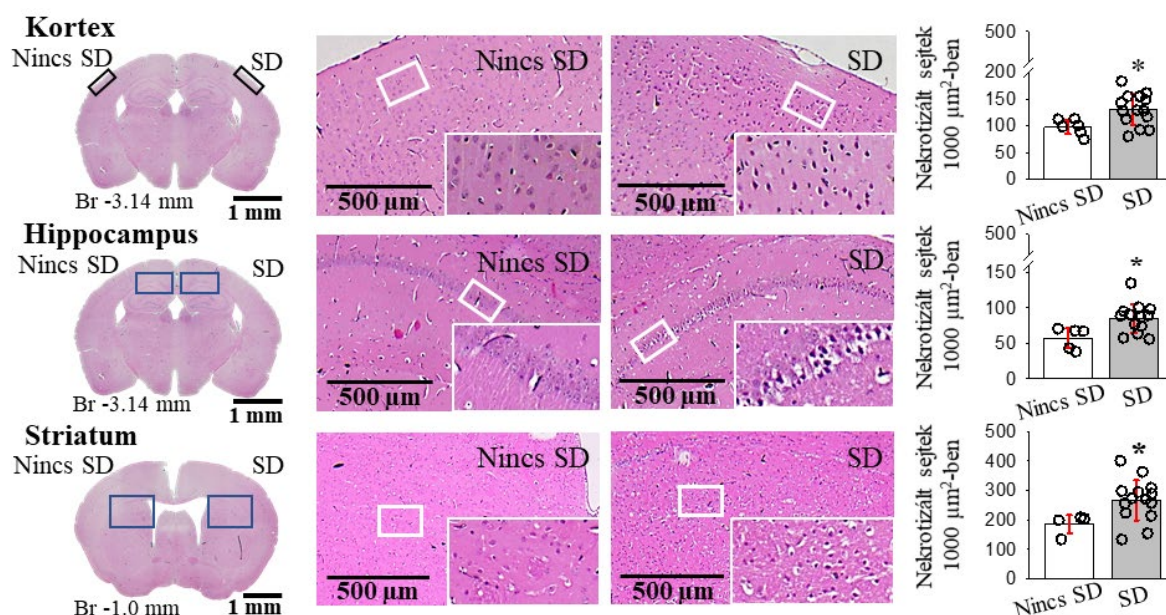


18. ábra Az iszkémia során fellépő SD és az azt követő elégtelen reperfúzió súlyos neurológiai deficittel és kifejezett neuronális nekrozissal jár 24 órával az iszkémia után. A szenzimotoros deficit a Garcia Neuroscore (GN) skálán ábrázolva egy nappal az iszkémia után az iszkémia előtti teljesítményhez viszonyítva (A). A kiválasztott motoros teszteredmények aszimmetrikus motoros funkciót mutattak, amely az SD megjelenéséhez köthető (B). Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel értékeltük (A, $p=0,599$, B, $p<0,050$, B, $p<0,050$, B, $p<0,050$), majd egyirányú RM ANOVA Holm-Sidak post-hoc (A) és Kruskal-Wallis ANOVA (B) tesztet alkalmaztunk.



19. ábra A reperfúzió után 45 perccel lineáris korreláció figyelhető meg a GN pontszám és az elégtelen reperfúzió között. Az adatok eloszlását Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk.

Végezetül, a neuronális nekrosis mértéke magasabb volt az SD-vel és az elégtelen reperfúzióval érintett hemiszfériumokban az összes vizsgált agyi régiókban. (például a parietális kortexben: 130 ± 2 vs. 97 ± 13 sejtszám/ $1000 \mu\text{m}^2$, SD vs. nincs SD) (20. ábra).

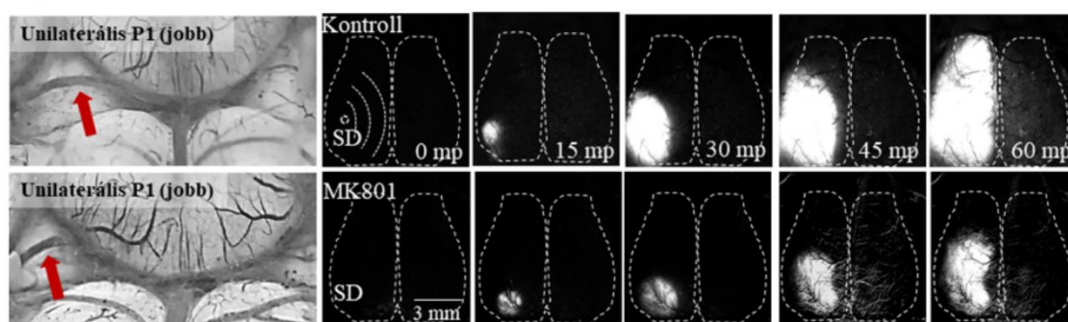


20. ábra Neuronális nekrosis látható a hematoxinil-eozin (HE) festett metszeteken. A grafikonokon az adatokat átlag $\pm$ szórás formában adtuk meg. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel értékeltük ($p = 0,200$), majd egyirányú RM ANOVA Holm-Sidak post-hoc teszttel $p < 0,05^*$ és $p < 0,01^{**}$ vs. nincs SD.

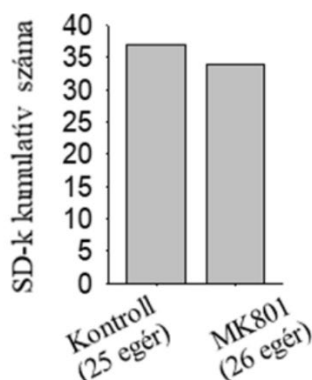
4.5. A farmakológiai SD gátlás megakadályozza az elégtelen reperfúzió kialakulását

Az NMDA receptor antagonisták gátolják, de nem blokkolják teljesen az SD-t (Andrew és mtsai. 2022, Petzold és mtsai. 2005). Az MK801 alkalmazásával az volt a célunk, hogy megerősítsük, az SD – és nem konkrétan csak az inkomplett Willis-kör önmagában – játszik szerepet az elégtelen reperfúzióban. Várakozásainknak megfelelően az MK801 gyengítette az SD-t, amit az SD-vel érintett terület csökkenése ($76,1 \pm 10,4$ vs. $87,7 \pm 6,5\%$, MK801 vs. kontroll) és az SD csökkent terjedési sebessége ($3,2 \pm 1,3$ vs. $4,2 \pm 1,4$ mm/perc, MK801 vs. kontroll). tükröz. (21. ábra)

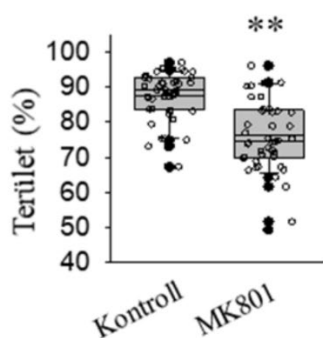
A



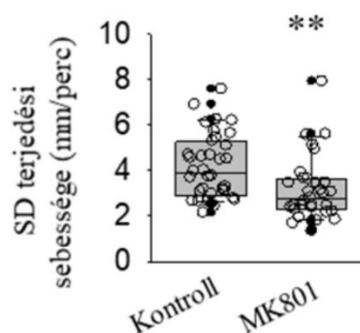
B



C



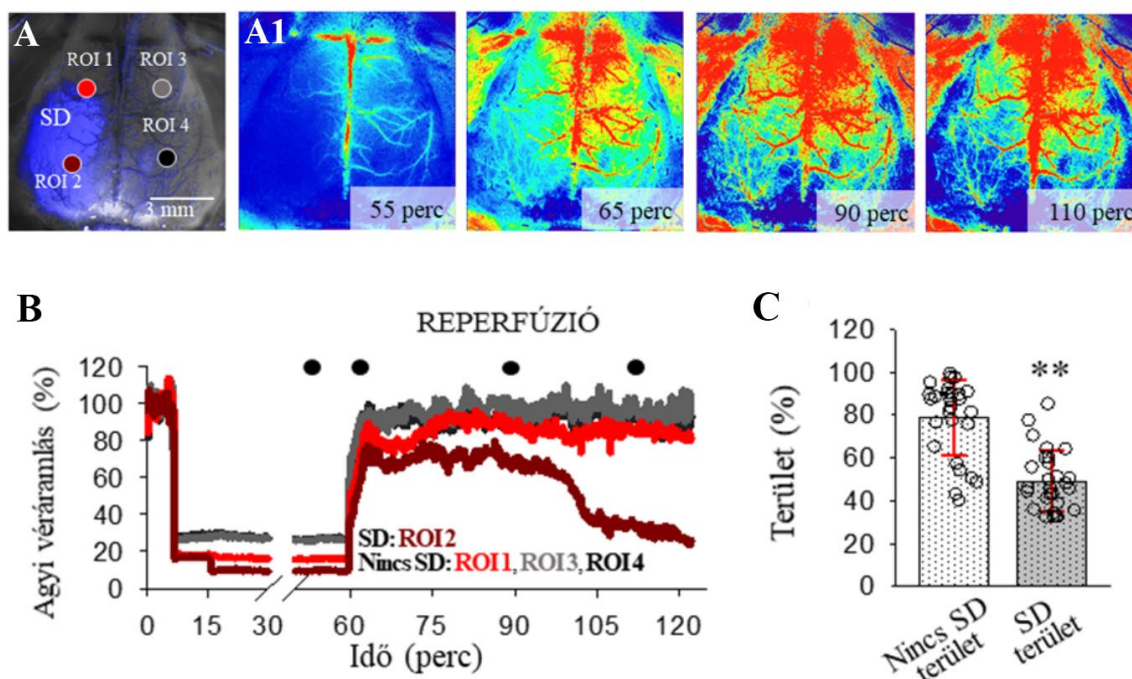
D



21. ábra Az SD farmakológiai gátlása ellensúlyozza az elégtelen reperfúziót. A háttér kivonása után készült reprezentatív IOS képek a bal P1 szegmens hiányát és az ahhoz köthető SD kialakulását mutatják az agyalapon. Megfigyelhető, hogy az SD a kontroll egérben a teljes ipsilaterális kérget lefedte, míg az MK801 kezelt preparátumban az SD kiterjedése kisebbnek bizonyult (A). Az MK801 nem blokkolta az SD előfordulását (B), de csökkentette az SD által érintett agykérgi felület területét (C) és lassította az SD terjedési sebességét (D). Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel értékeltük (C, $p = 0,123$, D, $p < 0,050$), majd Mann-Whitney Rank Sum teszt (C és D) $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ követte.

Az MK801 kezelésben részesülő csoportban az SD-vel érintett terület csökkenése lehetőséget adott arra, hogy teszteljük a reperfúzió hatékonyságát egy olyan kortikális régióban, amelyet nem érintett SD, mégis az ipsilaterális féltekén van (22. ábra (A1)) Mint azt már korábban bemutattuk, az SD által érintett kortikális területen a reperfúzió elégtelen volt. Jelen esetben az SD-vel érintett félteke azon területén, ahová az SD hullámfrontja már nem terjedt el a blokkolásnak köszönhetően, a reperfúzió optimális volt ($78,8 \pm 17,6$ vs. $49,2 \pm 1,0\%$, SD által nem érintett terület vs. SD által érintett terület) (22. ábra). Összhangban az SD gátlás révén kialakult perfúzió javulással az MK80-el kezelt egerek magasabb pontszámot értek el a funkcionális teszten egy nappal az iszkémia indukálása után (GN érték: $17,5 \pm 1,9$ vs. $14,6 \pm 2,5$, MK801 vs. kontroll), habár a neuronális nekrozis nem csökkent (parietális kortex $103,11 \pm 23,47$ vs. $119,4 \pm 30,71$ sejtszám/ $1000 \mu m^2$, MK801 vs. kontroll; hippocampusz: $90,55 \pm 25,04$ vs.

75,33±22,31 sejtszám/1000 μm^2 , MK801 vs. kontroll; striátum: 231,56±83.81 vs. 247,92±70,9 sejtszám/1000 μm^2 , MK801 vs. kontroll).



22. ábra Az IOS kép demonstrálja a kortikális felszínt. A bal oldali kortikális kéregben az SD által lefedett terület kék színnel látható. A ROI1-et az SD által nem érintett felszín felett helyeztük el. Ezzel szemben a ROI2-t az SD által érintett területen belül pozicionáltuk (A). A ROI3-4-et a kontralaterális kéreg felett helyeztük el. A Speckle felvételek (A1) és a kvantitatív analízis (B) is azt mutatja, hogy az elégtelen reperfúzió a már korábban SD által érintett területen ("SD terület") alakult ki, de a reperfúzió elegendő volt ugyanabban a féltekében egy olyan területen, amelyet nem érintett az SD ("Nincs SD terület"). Az adatokat átlag $\pm$ szórás formában adtuk meg. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk tesztet (C, $p=0,050$) követő T-teszttel (C), $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$ értékeltük ki.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Ez a tanulmány arra hivatottan készült, hogy demonstrálja az agyi iszkémiát követően kialakuló SD döntő szerepét az elégtelen reperfüzió kialakulásában. Az iszkémiás SD megbízható előrejelzőjének bizonyul a sikeres rekanalizáció ellenére bekövetkező sikertelen reperfüciónak. Ez egy jelentős megállapítás lehet, hiszen a stroke páciensek közel felénél, akiket endovaszkuláris terápiával vagy trombektómiával kezelnek, a rekanalizáció sikertelen és a funkcionális kimenetelük sem kielégítő az optimális angiográfiás eredmények ellenére^{9, 10}. Számos tanulmányban szereplő adatok alátámasztják, hogy a technikailag sikeres rekanalizációs terápia nem minden esetben biztosít elegendő perfúziót az iszkémiás stroke kezelésében^{9, 10}. Ez részben a no-reflow jelenségnek tulajdonítható, ami a mikrovaszkuláris érhálózat szintjén jelenik meg. A nagy ér sikeres rekanalizációja ellenére, a mikrocirkuláció áramlása nem áll vissza a kezdeti szintre a kis arteriolák és kapillárisok veszélyeztetett átjárhatósága miatt^{52, 53}. Nemrég kimutatták, hogy az SD által okozott vazokonstrikció az egéragyban a kapilláris ágyakból indul ki⁵⁴. Továbbá, annak ellenére, hogy a CBF válasz 30 másodperccel az SD után történik, a későbbi oligémia az egészséges agyszövetben több, mint egy óráig tarthat, ami a cerebrovaszkuláris reaktivitás károsodásával egybeesik^{28, 55}. Mindent együttevén, az valószínűsíthető, hogy az SD szerepe döntő jelentőségű a hosszan tartó mikrovaszkuláris konstrikcióban és a lehetséges kapilláris eltömődésekben. Az SD-re adott CBF válasz a folyamatban termelődő vazodilatátor és vazokonstriktor anyagok egyensúlyától függ²⁸. Súlyos iszkémia alatt a vazokonstriktor anyagok túltermelésének eredményeként a válaszreakció felülíródik, ami terjedő iszkémiaként ismert⁵⁶ és addig tart, amíg a depolarizáció, amit mi is megfigyeltünk. Az SD-hez köthető vazokonstrikció a magas extracelluláris K⁺ ion koncentráció³⁰ és a felgyülemelő arachidonsav származékok⁵⁷, mint például a 20-hidroxi-eikozatetranoésav (20-HETE)⁵⁸ és prosztaglandin F2 α (PGF2 α)^{59, 60} befolyása alatt áll. Úgy tűnik, hogy az SD megjelenésére termelődő 20-HETE és PGF2 α mediálják a hosszantartó oligémiát az optimálisan perfundált agyszövetben⁵⁸⁻⁶⁰. Továbbá kimutatták, hogy a 20-HETE károsítja a neuronális aktivitás által előidézett vazodilatációt a fokális agyi iszkémia kísérletekben⁶¹, ami analóg lehet az SD alatti dilatáció depressziójával^{31, 62}.

Tanulmányunk másik szignifikáns megfigyelése, hogy az SD feltűnése a Willis-kör hiányos kollaterálisainak tulajdonítható. A Willis-kör anatómiai rendellenességei gyakoriak a C57BL/6J egértörzsben⁶³, csak úgy, mint az egészséges humán populációban⁶⁴. Az ACP P1 szegmensének hipopláziája vagy hiánya a második leggyakoribb vaszkuláris változat az emberi Willis-köri anomáliái közül⁶⁴, ami szignifikánsan nagyobb CBF esést okoz a középső agyi

artéria okklúziója után. A CBF kritikus szint alá csökkenése, amit az SD megjelenése követett, korrelál az SD keletkezésének hipoperfúziós küszöbértékével³¹. Valójában a nem megfelelő kollaterális keringés nagyobb végső infarktustérfogattal és rosszabb hosszútávú neurológiai deficittel korrelál a stroke-os betegeknek⁶⁵. Modellünkben az SD farmakológiai gátlása megakadályozta a reperfúzió sikertelenségét az ACP P1 szegmensének hiánya ellenére is, ezzel tovább erősítve a kapcsolatot az SD előfordulása és az elégtelen reperfúzió között. Az NMDA receptor antagonist MK801 limitálta az SD terjedését, de jelenlétét nem tudta teljesen blokkolni. Ezen kívül úgy javította a neurológiai funkciókat, hogy nem csökkent a nekrotikus sejtek száma. Az MK801 részleges hatásai az NMDA receptor ligandkötő sajátosságaival magyarázhatóak. Például, az iszkémiás infarktusból a magas extracelluláris K^+ szint csökkenti az antagonist hatását⁶⁶. A core régió szöveti acidózisa esetén szintén látható az NMDA receptorokon beáramló Ca^{2+} influxjának blokkja⁶⁷, ami akadályozza az MK801-től várt hatást. Kísérletünkben nem azért használtunk hím és nőstény egereket, hogy a nem dimorfizmust is vizsgáljuk a populációban, viszont az adatok vizsgálatakor azt találtuk, hogy a nőstény egereknél alacsonyabb az SD előfordulása. A nőstényeknél az alacsonyabb SD gyakoriság a komplett Willis-körrel korrelált, amely kisebb CBF csökkenést eredményezett az érelzáródás után.

Következésképpen a jobb kollaterális keringés önmagában magyarázza a kevesebb SD-t nem pedig a nemek közötti különbség. A 2VO modell jelentős előnye, hogy az egész előagyban egy egységes penumbra-szerű állapotot hoz létre. Ami a legfontosabb volt számunkra a 2VO modellben, hogy a bilaterális carotis okklúzió után az SD megjelenése attól függ, hogy az elzáródás utáni perfúzió csökkenés eléri-e a küszöbérték alatti értéket. Ez az állapot ugyanis lehetővé teszi számunkra, hogy iszkémiás penumbra-szerű állapotban figyeljük meg az SD hatásait.

Végezetül tehát azt az új koncepciót terjesztjük elő, hogy a stroke utáni sikeres rekanalizáció ellenére létrejövő elégtelen reperfúzió fő indikátora az SD. A kísérletünk újszerű koncepcionális aspektusa az, hogy az elégtelen reperfúzió – amit előzőleg több más mechanizmushoz kapcsolnak, mint például a mikrotrombózis, a periciták általi disztális kapilláris konstriktio, a felgyülemlett neutrofilek akadályai az érben, a nagy erek konstriktioja és a disztális vérrög embolizáció⁵³ – az iszkémiában létrejövő SD következménye. Továbbá, eredményeink arra adnak következtetést, hogy a hiányos kollaterális keringés súlyosabb véráramlás eséshez vezet az agyi keringés okklúziója után, ami kedvező körülményeket hoz létre az SD megjelenésének. A kollaterálisok ritkulása az agy öregedésével hozható össze, ami rontja az időskori stroke kimenetelét^{68, 69}. Ez növeli eredményeink jelentőségét, hiszen a stroke

előfordulása exponenciálisan növekszik az öregedő népességben. Tehát kijelenthetjük, hogy az elégtelen reperfúzió mechanizmusának okozója az SD általi tartós vazokonstrikció, ami elsősorban a mikrovaskulárisok szintjén alakul ki. Végezetül, úgy tűnik, hogy az SD utáni elégtelen reperfúzió a súlyosabb neurológiai deficit okozója, ami a stroke utáni rosszabb kimenetelhez vezethet. A hiábavaló rekanalizáció és az SD azonosítása fontos tényező lehet az új terápiás lehetőségeket tekintve, amelyekkel a stroke kimenetelét kedvezőbb irányba lehetne elmozdítani. Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a Willis-köri kollaterális keringés elemeinek hiánya agyi érelzáródás után súlyosabb perfúzió csökkenéshez vezet, ami előrevetíti az SD megjelenését. Az SD következtében kialakult tartós vazokonstrikció elégtelen reperfúziót okoz, ami neuronális nekrozist indukál, és rossz neurológiai kimenetelhez vezethet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Törteli Annának és Dr. Menyhárt Ákosnak a munkámhoz nyújtott önzetlen szakmai és emberi segítségét. Köszönettel tartozom Farkas Eszter Professzorasszonynak, hogy lehetőséget adott, hogy a tanszéken és a kutatócsoportjában dolgozhassak. Végül pedig köszönöm a segítséget az Agyi Keringés és Metabolizmus Kutatócsoport minden munkatársának.

A kutatás az NKFIH (K134377, FK142218), Horizon 2020 (No. 739593). Nemzeti Agykutatási Program 3.0 által biztosított forrásokból valósult meg.

IRODALOM ÉS FÜGGELÉKEK

1. Collaborators GBDS. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 2019; 18: 439-458. 2019/03/16. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1.
2. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke* 2022; 17: 18-29. 2022/01/07. DOI: 10.1177/17474930211065917.
3. Yousufuddin M and Young N. Aging and ischemic stroke. *Aging (Albany NY)* 2019; 11: 2542-2544. 2019/05/03. DOI: 10.18632/aging.101931.
4. de Jonge JC, Sluis WM, Reinink H, et al. Prevention of infections and fever to improve outcome in older patients with acute stroke (PRECIOUS): a randomised, open, phase III, multifactorial, clinical trial with blinded outcome assessment. *Lancet Reg Health Eur* 2024; 36: 100782. 2023/12/11. DOI: 10.1016/j.lanepe.2023.100782.
5. Gauberti M, De Lizarrondo SM and Vivien D. The "inflammatory penumbra" in ischemic stroke: From clinical data to experimental evidence. *Eur Stroke J* 2016; 1: 20-27. 2016/03/01. DOI: 10.1177/2396987316630249.
6. Menyhart A, Frank R, Farkas AE, et al. Malignant astrocyte swelling and impaired glutamate clearance drive the expansion of injurious spreading depolarization foci. *J Cereb Blood Flow Metab* 2022; 42: 584-599. 2021/08/25. DOI: 10.1177/0271678X211040056.
7. Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, et al. Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 2084-2097. 2016/07/28. DOI: 10.1177/0271678X16660986.
8. Rha JH and Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007; 38: 967-973. 2007/02/03. DOI: 10.1161/01.STR.0000258112.14918.24.
9. Hussein HM, Georgiadis AL, Vazquez G, et al. Occurrence and predictors of futile recanalization following endovascular treatment among patients with acute ischemic stroke: a multicenter study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 454-458. 2010/01/16. DOI: 10.3174/ajnr.A2006.
10. Espinosa de Rueda M, Parrilla G, Manzano-Fernandez S, et al. Combined Multimodal Computed Tomography Score Correlates With Futile Recanalization After Thrombectomy in Patients With Acute Stroke. *Stroke* 2015; 46: 2517-2522. 2015/07/30. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.008598.
11. Kaesmacher J, Boeckh-Behrens T, Simon S, et al. Risk of Thrombus Fragmentation during Endovascular Stroke Treatment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2017; 38: 991-998. 2017/03/11. DOI: 10.3174/ajnr.A5105.
12. Deng J, Zhang Y, He G, et al. Arterial wall injury and miRNA expression induced by stent retriever thrombectomy under stenotic conditions in a dog model. *J Neurointerv Surg* 2021; 13: 563-567. 2020/08/30. DOI: 10.1136/neurintsurg-2020-016347.
13. Brown LS, Foster CG, Courtney JM, et al. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 282. 2019/07/19. DOI: 10.3389/fncel.2019.00282.
14. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, et al. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009; 15: 1031-1037. 2009/09/01. DOI: 10.1038/nm.2022.
15. del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, et al. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22: 1276-1283. 1991/10/01. DOI: 10.1161/01.str.22.10.1276.
16. Ishikawa M, Sekizuka E, Sato S, et al. Effects of moderate hypothermia on leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1999; 30: 1679-1686. 1999/08/06. DOI: 10.1161/01.str.30.8.1679.

17. Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, et al. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 2000; 31: 1153-1161. 2000/05/08. DOI: 10.1161/01.str.31.5.1153.
18. Jung S, Wiest R, Gralla J, et al. Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. *Swiss Med Wkly* 2017; 147: w14538. 2017/12/13. DOI: 10.4414/smw.2017.14538.
19. Westphal LP, Lohaus N, Winklhofer S, et al. Circle of Willis variants and their association with outcome in patients with middle cerebral artery-M1-occlusion stroke. *Eur J Neurol* 2021; 28: 3682-3691. 2021/07/08. DOI: 10.1111/ene.15013.
20. Kuschinsky W and Paulson OB. Capillary circulation in the brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4: 261-286. 1992/01/01.
21. Lin E, Kamel H, Gupta A, et al. Incomplete circle of Willis variants and stroke outcome. *Eur J Radiol* 2022; 153: 110383. 2022/06/07. DOI: 10.1016/j.ejrad.2022.110383.
22. Hartings JA, Andaluz N, Bullock MR, et al. Prognostic Value of Spreading Depolarizations in Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol* 2020; 77: 489-499. 2019/12/31. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.4476.
23. Wijesinghe P, Steinbusch HWM, Shankar SK, et al. Circle of Willis abnormalities and their clinical importance in ageing brains: A cadaveric anatomical and pathological study. *J Chem Neuroanat* 2020; 106: 101772. 2020/03/14. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2020.101772.
24. Menshawi K, Mohr JP and Gutierrez J. A Functional Perspective on the Embryology and Anatomy of the Cerebral Blood Supply. *J Stroke* 2015; 17: 144-158. 2015/06/11. DOI: 10.5853/jos.2015.17.2.144.
25. Shaban A, Albright KC, Boehme AK, et al. Circle of Willis Variants: Fetal PCA. *Stroke Res Treat* 2013; 2013: 105937. 2013/04/12. DOI: 10.1155/2013/105937.
26. Tanaka H, Fujita N, Enoki T, et al. Relationship between variations in the circle of Willis and flow rates in internal carotid and basilar arteries determined by means of magnetic resonance imaging with semiautomated lumen segmentation: reference data from 125 healthy volunteers. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1770-1775. 2006/09/15.
27. Hecht N, He J, Kremenetskaia I, et al. Cerebral hemodynamic reserve and vascular remodeling in C57/BL6 mice are influenced by age. *Stroke* 2012; 43: 3052-3062. 2012/08/28. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.653204.
28. Ayata C and Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev* 2015; 95: 953-993. 2015/07/03. DOI: 10.1152/physrev.00027.2014.
29. Woitzik J, Hecht N, Pinczolis A, et al. Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology* 2013; 80: 1095-1102. 2013/03/01. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182886932.
30. Menyhart A, Farkas AE, Varga DP, et al. Large-conductance Ca(2+)-activated potassium channels are potently involved in the inverse neurovascular response to spreading depolarization. *Neurobiol Dis* 2018; 119: 41-52. 2018/07/28. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.07.026.
31. Menyhart A, Zolei-Szenasi D, Puskas T, et al. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep* 2017; 7: 1154. 2017/04/27. DOI: 10.1038/s41598-017-01284-4.
32. Dreier JP, Lemale CL, Kola V, et al. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacology* 2018; 134: 189-207. 2017/09/25. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.027.
33. Andrew RD, Farkas E, Hartings JA, et al. Questioning Glutamate Excitotoxicity in Acute Brain Damage: The Importance of Spreading Depolarization. *Neurocrit Care* 2022; 37: 11-30. 2022/02/24. DOI: 10.1007/s12028-021-01429-4.
34. Toth OM, Menyhart A, Varga VE, et al. Chitosan nanoparticles release nimodipine in response to tissue acidosis to attenuate spreading depolarization evoked during forebrain ischemia. *Neuropharmacology* 2020; 162: 107850. 2019/11/13. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107850.

35. Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, et al. The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leao's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1571-1594. 2016/06/23. DOI: 10.1177/0271678X16654495.
36. Pietrobon D and Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15: 379-393. 2014/05/27. DOI: 10.1038/nrn3770.
37. Hoffmann U and Ayata C. Neurovascular coupling during spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl* 2013; 115: 161-165. 2012/08/15. DOI: 10.1007/978-3-7091-1192-5_31.
38. Luckl J, Lemale CL, Kola V, et al. The negative ultraslow potential, electrophysiological correlate of infarction in the human cortex. *Brain* 2018; 141: 1734-1752. 2018/04/19. DOI: 10.1093/brain/awy102.
39. Dreier JP, Winkler MKL, Major S, et al. Spreading depolarizations in ischaemia after subarachnoid haemorrhage, a diagnostic phase III study. *Brain* 2022; 145: 1264-1284. 2022/04/13. DOI: 10.1093/brain/awab457.
40. Sanchez-Porras R, Zheng Z and Sakowitz OW. Pharmacological modulation of spreading depolarizations. *Acta Neurochir Suppl* 2015; 120: 153-157. 2014/11/05. DOI: 10.1007/978-3-319-04981-6_26.
41. Dreier JP and Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 2015; 86: 902-922. 2015/05/23. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.04.004.
42. Seillier C, Lesept F, Toutirais O, et al. Targeting NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases. *Int J Mol Sci* 2022; 23 2022/09/24. DOI: 10.3390/ijms231810336.
43. Sanchez van Kammen M, Moomaw CJ, van der Schaaf IC, et al. Heritability of circle of Willis variations in families with intracranial aneurysms. *PLoS One* 2018; 13: e0191974. 2018/01/30. DOI: 10.1371/journal.pone.0191974.
44. Gill R, Andine P, Hillered L, et al. The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 371-379. 1992/05/01. DOI: 10.1038/jcbfm.1992.54.
45. Yaghoobi Z, Ataei S, Riahi E, et al. Neuroprotective effects of MK-801 against cerebral ischemia reperfusion. *Heliyon* 2024; 10: e33821. 2024/07/23. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e33821.
46. Marrannes R, Willems R, De Prins E, et al. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res* 1988; 457: 226-240. 1988/08/09. DOI: 10.1016/0006-8993(88)90690-7.
47. Hernandez-Caceres J, Macias-Gonzalez R, Brozek G, et al. Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 1987; 437: 360-364. 1987/12/29. DOI: 10.1016/0006-8993(87)91652-0.
48. Muller M and Somjen GG. Inhibition of major cationic inward currents prevents spreading depression-like hypoxic depolarization in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res* 1998; 812: 1-13. 1998/11/14. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00812-9.
49. Carlson AP, Abbas M, Alunday RL, et al. Spreading depolarization in acute brain injury inhibited by ketamine: a prospective, randomized, multiple crossover trial. *J Neurosurg* 2019; 130: 1513-1519. 2018/05/26. DOI: 10.3171/2017.12.JNS171665.
50. Sakowitz OW, Kiening KL, Krajewski KL, et al. Preliminary evidence that ketamine inhibits spreading depolarizations in acute human brain injury. *Stroke* 2009; 40: e519-522. 2009/06/13. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.549303.
51. Santos E, Olivares-Rivera A, Major S, et al. Lasting s-ketamine block of spreading depolarizations in subarachnoid hemorrhage: a retrospective cohort study. *Crit Care* 2019; 23: 427. 2020/01/01. DOI: 10.1186/s13054-019-2711-3.
52. Soares BP, Chien JD and Wintermark M. MR and CT monitoring of recanalization, reperfusion, and penumbra salvage: everything that recanalizes does not necessarily reperfuse! *Stroke* 2009; 40: S24-27. 2008/12/10. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.526814.

53. El Amki M and Wegener S. Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke. *Int J Mol Sci* 2017; 18 2017/12/14. DOI: 10.3390/ijms18122669.
54. Anzabi M, Li B, Wang H, et al. Optical coherence tomography of arteriolar diameter and capillary perfusion during spreading depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 2021; 41: 2256-2263. 2021/02/18. DOI: 10.1177/0271678X21994013.
55. Lacombe P, Sercombe R, Correze JL, et al. Spreading depression induces prolonged reduction of cortical blood flow reactivity in the rat. *Exp Neurol* 1992; 117: 278-286. 1992/09/01. DOI: 10.1016/0014-4886(92)90137-f.
56. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 2011; 17: 439-447. 2011/04/09. DOI: 10.1038/nm.2333.
57. Shibata M, Leffler CW and Busija DW. Prostanoids attenuate pial arteriolar dilation induced by cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol* 1991; 261: R828-834. 1991/10/01. DOI: 10.1152/ajpregu.1991.261.4.R828.
58. Fordsmann JC, Ko RW, Choi HB, et al. Increased 20-HETE synthesis explains reduced cerebral blood flow but not impaired neurovascular coupling after cortical spreading depression in rat cerebral cortex. *J Neurosci* 2013; 33: 2562-2570. 2013/02/09. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2308-12.2013.
59. Garipey H, Zhao J and Levy D. Differential contribution of COX-1 and COX-2 derived prostanoids to cortical spreading depression-Evoked cerebral oligemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1060-1068. 2016/05/15. DOI: 10.1177/0271678X16650217.
60. Varga DP, Szabo I, Varga VE, et al. The antagonism of prostaglandin FP receptors inhibits the evolution of spreading depolarization in an experimental model of global forebrain ischemia. *Neurobiol Dis* 2020; 137: 104780. 2020/01/29. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.104780.
61. Li Z, McConnell HL, Stackhouse TL, et al. Increased 20-HETE Signaling Suppresses Capillary Neurovascular Coupling After Ischemic Stroke in Regions Beyond the Infarct. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 762843. 2021/11/26. DOI: 10.3389/fncel.2021.762843.
62. Hertelendy P, Menyhart A, Makra P, et al. Advancing age and ischemia elevate the electric threshold to elicit spreading depolarization in the cerebral cortex of young adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1763-1775. 2016/05/18. DOI: 10.1177/0271678X16643735.
63. Fujii M, Hara H, Meng W, et al. Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke* 1997; 28: 1805-1810; discussion 1811. 1997/09/26. DOI: 10.1161/01.str.28.9.1805.
64. Iqbal S. A comprehensive study of the anatomical variations of the circle of willis in adult human brains. *J Clin Diagn Res* 2013; 7: 2423-2427. 2014/01/07. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6580.3563.
65. Kimmel ER, Al Kasab S, Harvey JB, et al. Absence of Collaterals is Associated with Larger Infarct Volume and Worse Outcome in Patients with Large Vessel Occlusion and Mild Symptoms. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2019; 28: 1987-1992. 2019/05/01. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.03.032.
66. Petzold GC, Windmuller O, Haack S, et al. Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* 2005; 36: 1270-1277. 2005/05/10. DOI: 10.1161/01.STR.0000166023.51307.e0.
67. Plutino S, Sciacaluga M and Fucile S. Extracellular mild acidosis decreases the Ca²⁺ permeability of the human NMDA receptors. *Cell Calcium* 2019; 80: 63-70. 2019/04/13. DOI: 10.1016/j.ceca.2019.04.001.
68. Riddle DR, Sonntag WE and Lichtenwalner RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 149-168. 2003/02/28. DOI: 10.1016/s1568-1637(02)00064-8.
69. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, et al. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1748-1756. 2011/05/28. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.227314.

**A 36. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Erős Mihály** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **A terjedő depolarizáció elégtelen reperfúziót okoz az akut iszkémiás stroke egér modelljében** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

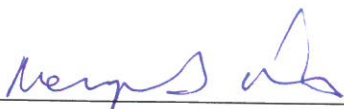
Részfeladat^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán[#] jellemezve)
<i>Irodalmi áttekintés</i>	3
<i>Kapcsolódó cikkek feldolgozása</i>	5
<i>Kísérletekben részvétel</i>	4
<i>Egér mobilizálása, testúly mérése</i>	5
<i>Operatív lépések végzése</i>	5
<i>Lézer speckle és zöld fény vizsgálódás asszisztencia</i>	5
<i>Garcia neuroscore értékelés</i>	5
<i>Transzkardiális perfúzió asszisztencia</i>	5
<i>Willis-kör megfigyelése mikroszkóp alatt</i>	4

Kelt: Szeged, 2024. 11. 08.



Erős Mihály
Pályamunkát benyújtó hallgató

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Menyhárt Ákos, SZAOK Sejtbiológia és
Molekuláris Medicina Tanszék
Témavezető



Törteli Anna, SZAOK Sejtbiológia és Molekuláris
Medicina Tanszék
Társtémavezető

