

PATKÁNYAGY VIZSGÁLATA HYPOXIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT MULTIMODÁLIS KÉPALKOTÓ ELJÁRÁSSAL

Szerző:

Kozák Gábor

Témavezetők:

Prof. Bari Ferenc intézetvezető egyetemi tanár

SZTE ÁOK Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Dr. Institoris Ádám egyetemi tanársegéd

SZTE ÁOK Élettani Intézet

2014

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás.....	3
2. Bevezetés.....	4
A stroke pathomechanizmusa.....	5
Agykérgi kúszó depolarizáció.....	6
Depolarizáció sérült szövetben.....	7
3. Célkitűzés.....	9
4. Anyagok és módszerek.....	10
Műtési protokoll.....	10
Kísérleti protokoll.....	11
Multimodális képalkotó eljárás.....	12
Kérgi reflektancia mérések.....	12
Teljes vértérfogat változása.....	13
Deoxi-hemoglobin arány.....	13
Fluoreszcencia mérés.....	13
Lézerfolt interferencia mérés.....	14
Szinkronizáció.....	14
Méréstechnikai megjegyzések.....	14
Jelanalízis.....	15
Egy-pont analízis.....	15
Teljes-ablak analízis.....	17
Statisztika.....	21
5. Eredmények.....	23
Új analízis.....	23
Vérátáramlás változások tMCAO alatt.....	23
A tranziens és megnyúlt SD-k gyakorisága és térbeli kiterjedése.....	24
Kapcsolat az SD típusa és a hemodinamikai válasz között.....	26
Kapcsolat az SD típusa és a súlyosan iszkémiás terület nagysága között.....	26
6. Megbeszélés.....	28
Új analízis.....	28
Az öregedés hatása.....	29
Kiterjedtebb megnyúltan depolarizálódó területek idősekben.....	29
7. Rövidítések jegyzéke.....	31
8. Irodalomjegyzék.....	32
9. Köszönetnyilvánítás.....	38

Összefoglalás

Bevezetés

Az agyi iszkémia során jelentkező agykérgi depolarizációs hullámok (SD) tovább rontják a metabolizmus és vérrellátás közötti aránytalanságot, befolyásolva a stroke-os betegek túlélési esélyeit. Noha a stroke legfontosabb prediktív tényezője az életkor, még egyetlen kutatás sem vizsgálta a kapcsolatot az SD-k előfordulási gyakorisága és az életkor között.

Anyagok és módszerek

Műteteinket hím Wistar patkányokon végeztük, melyeket három csoportra osztottunk életkor szerint: fiatal (hat hetes életkor; $n=7$), középidős (9 hónapos életkor; $n=6$) és idős (2 éves életkor; $n=7$). Az állatokban 30 perc hosszúságú tranziens arteria cerebri media okklúziót hoztunk létre és az okklúzió alatt megfigyelhető elektrofiziológiai és hemodinamikai változásokat karakterizáltuk multimodális képalkotó eljárás segítségével, zárt koponyaablakon keresztül. Az ablakot feszültségfüggő festékkel (RH1838) töltöttük fel, melynek fluoreszcenciája a kérgi membránpotenciál változást jelezte. Az agykérget piros, illetve zöld fénnel világítottuk meg, melyek reflektanciájából a hemoglobin szaturációra és a lokális agyi vértérfogot változásaira következtettünk. Az agyi vérátáramlás meghatározására lézer folt-interferencia kontraszt analízist alkalmaztunk. A multimodális képalkotó eljárás regisztrátumainak elemzéséhez új kiértékelő programot hoztunk létre.

Eredmények

Kimutattuk, hogy a vérátáramlás kezdeti csökkenése hasonló minden korcsoportban, viszont idősek patkányokban további szignifikáns áramlásesés figyelhető meg ($P<0,01$). Az öregedéssel csökken az SD-k száma ($P<0,05$), viszont nő azon területeknek a nagysága, amely elnyújtott SD-nek van kitéve ($P<0,01$). A megnyúlt SD terjedése pozitívan korrelál a súlyosan iszkémiás terület nagyságával ($P<0,01$).

Bevezetés

Szomorú tény, hogy ma Magyarországon átlagosan 10 percenként legalább egy ember stroke-ot kap, s ezen emberek közül sajnos minden negyediket elveszítjük. A Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján csak 2012-ben 13081-en haláloztak el agyér-megbetegedés következtében, azaz a harmadik leggyakoribb halálok volt hazánkban, miközben összesen 129440 embert veszítettünk el abban az évben. Általánosságban pedig elmondhatjuk, hogy közel ugyanilyen lesújtó a helyzet a többi, fejlett nyugati országban is, s nemcsak hogy az egyik leggyakoribb halálokról beszélünk, hanem a munkaképtelenség legfontosabb okaként is megjelölhető, igen nagy terhet róva ezzel a társadalom egészére [1].

A stroke a WHO definíciója szerint „az agyműködés vérellátási zavara által okozott globális vagy fokális neurológiai diszfunkcióval járó, gyorsan kialakuló tünetegyüttes, mely több, mint 24 órán keresztül fennáll és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agy érrendszerében kialakult változás.” [2]

Noha az agyér-katasztrófák bármilyen korban előfordulhatnak, közismert tény, hogy gyakorisága az életkor előrehaladtával nő, azaz leginkább az idősek érintettek [3]. Korábbi klinikai és kutatási adatok azt mutatják, hogy azonos méretű okklúzió esetén az infarktus mérete nem különbözik fiatal és idős egyedekben, de idősebb korban az infarktus kialakulása gyorsabb és a mortalitás magasabb [4,5]. Emellett az is igaz, hogy az életben maradt stroke-ot elszenvedett körében idősebb korban a funkcionális kimenetel rosszabb és a felépülés (már ha beszélhetünk egyáltalán felépülésről) is lassabb [6,7].

Ezek a tények arra ösztönzik a kutatókat szerte a világon, beleértve a mi laborunkat is, hogy megkeressék azokat a tényezőket a stroke és az azt követő maradandó károsodások kifejlődése során, melyek a korcsoportok közti különbségeket okozhatják. Ezek megtalálása több szempontból is felbecsülhetetlen fontosságú lenne, hiszen egyfelől specifikus terápia kifejlesztésének ígéretével kecsegtet, másfelől pedig esetleg a maradandó szövődmények súlyosságának mérséklésével elősegíthetjük a stroke-ot elszenvedett emberek hamarabbi visszatérését a mindennapi életbe, illetve csökkenthető lenne a magas mortalitási ráta.

A stroke pathomechanizmusa

A stroke definíciójában szereplő vérellátási zavar a kialakulás mechanizmusa szerint lehet iszkémiás vagy vérzéses eredetű, melyek közül előfordulás szerint előbbi jóval gyakoribb (85%). Mivel szakdolgozatom témáját a hypoxiás körülmények vizsgálata képezi és az iszkémia talaján kialakuló események egyébként is jóval gyakrabban figyelhetők meg, a pathomechanizmus tárgyalása során csupán előbbi ismertetésére szorítkozom. Mindazonáltal a vérzéses kórképek során lejátszódó változások főbb vonalaiban, sejt szinten megfelelnek az itt ismertetetteknek.

Az agyi iszkémia az agy vérellátásának valamilyen okból bekövetkező csökkenését jelenti, mely többnyire kisebb-nagyobb erek elzáródásához köthető vagy ritkábban a vérellátás globális csökkenéséhez. Az elzáródás kialakulhat az (ateroszklerotikus) erek trombózisa vagy távoli területekről érkező embólia miatt. Ezen események közös vonása, hogy végeredményben elsődlegesen az agyszövet (fokális vagy globális) oxigénellátásának csökkenéséhez vezetnek, azaz hypoxiát okoznak [8].

Tudjuk azt, hogy az agyszövet különösen érzékeny a vérellátásban bekövetkező változásokra, az áramlás 3 percnél tovább tartó felfüggesztése már irreverzibilis károsodásokat képes okozni. Az agy kiemelkedő oxigén- és glükózsükségletét a normál körülmények között az agy vaszkulaturáján percenként átáramló 750-800 ml vér biztosítja, s ez az érték legfeljebb 550-600 ml/percre csökkenhet úgy, hogy a normál agyműködés még ne szenvedjen kárt. Ez az agy méretéhez képest (2%-a a test teljes tömegének) hatalmas mértékű oxigén- és energiaigény (20%-a a test nyugalmi energiaszükségletének) nagyrészt a nyugalmi membránpotenciál fenntartására fordítódik, amihez a szükséges adenoszin-trifoszfátot (ATP) szinte kizárólag oxidatív foszforilációval képes előállítani [9].

Ma már tudjuk azt, hogy a cerebrovaszkuláris történések utáni kimenetel nem csupán az elsődleges károsodás minőségétől és mértékétől függ, hanem úgy nevezett másodlagos folyamatok is legalább olyan jelentős szerepet játszanak ebben. Az oxigén- és energiaellátás megszűnése után fél percen belül az agy sejtjei felélik tartalékaikat, ami a nyugalmi membránpotenciál megszűnéséhez, a neuronok és gliák depolarizációjához vezet [10]. Ekkor, a feszültségfüggő csatornák aktivációja miatt Ca^{2+} -ionok áramlanak be a sejtekbe, ez pedig serkentő aminosavak felszabadulásához vezet. Ezzel párhuzamosan az energiadeficit miatt az aminosavak visszavétele is sérül,

így a posztzinaptikus sejtek folyamatosan aktiválva vannak. Így ozmotikusan aktív ionok áramlanak a sejtekbe (ami a sejtek duzzadásához vezet) és egyre több Ca^{2+} is felgyülemlik, ami a Ca^{2+} -függő, a sejtet károsítani képes enzimek aktiválódásához vezet [11,12,13].

Ezen kezdeti lépések mentén több (patológiás) folyamat indul útjára, név szerint az excitotoxicitás, a periinfarktus-depolarizációk, steril gyulladás és a sejtek késői apoptózisa, melyek mind hozzájárulnak a stroke bekövetkezte utáni nekrosis kifejlődéséhez az elsődleges eseményen (hypoxia) túl [14,15]. Ezek közül, mivel szakdolgozatomban csak a az iszkémiás körülmények között megfigyelhető depolarizációk szerepét vizsgáltuk, kizárólag ezt kívánom részletesen tárgyalni.

Agykérgi kúszó depolarizáció

Az agykérgi kúszó depolarizáció az agyszövet összehangolt, drasztikus mértékű depolarizációja, mely hullámszerűen végighalad(hat) az agykérgen. Ezen hullámokat egyszerű elektrofiziológiai módszerekkel, pl. dc potenciál méréssel lehet detektálni, az EEG jelen pedig jellegzetesen a spontán kérgi aktivitás depressziójával jár. Először 1944-ben Leao brazil élettanász detektálta a kérgi kúszó depolarizációt állat modellben [16]. Azóta már tudjuk azt, hogy az agykérgi kúszó depolarizáció spontán megfigyelhető emberekben is és azt is, hogy ép agyszövetben nem játszik szerepet sejtkárosító folyamatokban [17,18].

Noha még ma sem értjük a jelenséget minden részletében, jelenleg már rendelkezünk egy átfogó képpel, melynek segítségével a kúszó kérgi depolarizációs jelenségek (SD) számos aspektusa magyarázható. Kísérletes körülmények között az SD-k kiváltása számos különböző módon történhet, például különféle anyagok (kálium, glutamát, stb.) agyfelszínre csepegtetésével, az agyfelszín mechanikai megsértésével (tűszúrás), elektromos árammal, stb. Ekkor a depolarizáció hullámszerűen végighalad az agykérgen, 2-5 mm/perc sebességgel. A depolarizáció idején a sejtek ionhomeosztázisa szinte teljesen felborul, elvesztik elektromos aktivitásukat (ez azonosítható az EEG-jelen, mint ellaposodás), és az ozmotikusan aktív ionok beáramlása miatt a sejtek megduzzadnak, a dendrittüskék deformálódnak. A neuronok és a gliasejtek depolarizációja mellett megfigyelhető az extracelluláris térben a kálium- és glutamátszint növekedése [19].

A depolarizációk terjedését jelenleg több, egymást nem kizáró elmélettel

magyarázzák. Egyfelől szerepet játszhat benne az extracelluláris térben felszaporodó ágensek (glutamát, kálium) diffúziója (melyek önmagukban is képesek depolarizációt kiváltani) a kiindulási ponttól távolabbi régiókba, illetve történhet a neuronok vagy gliasejtek szoros sejtkapcsoló struktúráin (gap junction) keresztül [19,20].

Ha már a depolarizáció bekövetkezett és tovaterjedt, a depolarizálódott sejt törekszik a membránpotenciáljának helyreállítására, ami meglehetősen energiaigényes folyamat. Élettani körülmények között ekkor funkcionális hiperémia figyelhető meg és a megemelkedett vérátáramlás képes a megnövekedett szükségleteket is kielégíteni. Ennek hátterében egy neurovaszkuláris csatolásnak nevezett funkcionális egység áll, melyet szomszédos neuronok és gliasejtek alkotnak a hozzájuk közel eső kapilláris erekkel együtt. Ez a csatolás képes normál esetben rövid látenciaidővel adaptálni a agyszövetekhez eljutó metabolitok mennyiségét a mindenkori igényeknek megfelelően, mely mágneses rezonanciavizsgálatokkal kimutatható.

Ép szövetben tehát a neurovaszkuláris csatolás segítségével a kérgi kúszó depolarizációt egy kérgi kúszó hiperémia követi a megnövekedett igényeknek megfelelően, s a depolarizáció után a membránpotenciál igen gyorsan helyreáll. Részletesebben vizsgálva egyébként kimutatható, hogy a bekövetkező vérátáramlási válasz három komponensből áll, először egy rövid időtartamú (néhány perces) áramláscsökkenés (50-75%-os hipoperfúzió), majd a már leírt hiperémia (150-220%-os hiperperfúzió), végül pedig egy hosszú ideig (akár egy órán át) tartó áramlási redukció (50-75%-os hipoperfúzió) figyelhető meg [21,22,23].

Depolarizáció sérült szövetben

Sérült agyszövetben, vagy specifikusabban hypoxiás-iszkémiás körülmények között a fentebb részletezett kinetika megváltozik és a változó energetikai viszonyoktól függően térben és időben változó képet mutat [24,25]. Iszkémiás állatmodellben megfigyelték, hogy az úgy nevezett iszkémiás magban, ahol az oxigén- és energiahiány a legsúlyosabb, az agyszövet visszafordíthatatlanul depolarizálódik, ezt nevezik anoxiás depolarizációnak, utalva a kialakulás körülményeire, más nevezéktan pedig a depolarizáció végleges voltát hangsúlyozva terminális depolarizációnak keresztelte el. Távolodva az iszkémiás magtól a kollaterális erektől származó metabolitok, oxigén miatt a szövet túlélési esélyei egyre jobban, az itt megfigyelhető depolarizációkat térbeli megfontolások alapján nevezhetjük peri-infarktus depolarizációknak (PID) vagy a

kinetika alapján, mely szerint a depolarizáció után, noha az nem végleges, de hosszabb időt vesz igénybe a repolarizáció, mint ép szövetben, lehetnek megnyúlt depolarizációk [23].

Hypoxiás szövetben a depolarizációs jelenségek vérátáramlással való kapcsoltsága is megváltozhat [25,26]. A repolarizáció meglehetősen energiaigényes folyamat, ami a szöveti hypoxia miatt csak jóval lassabban vagy egyáltalán nem tud végbemenni, hiszen a rendelkezésre álló ATP-készlet és oxigénmennyiség nem képes fedezni a nyugalmi értékhez való gyors visszatérés energiaigényét. Így hosszabb idő alatt felszaporodhatnak a szövetben metabolikus bomlástermékek, a növekvő extracelluláris káliumszintet (mely bizonyos koncentráció felett már nem vazodilatációt, hanem -konstrikciót okoz) az asztroglia már nem képesek pufferelni, illetve számos olyan mechanizmus megfigyelhető, amely a NO vazodilatációs jelútját (nitroxiderg neuronok degenerációja, NO-szintáz inhibitorok felszaporodása, NO megkötése) valamilyen lépésben gátolják vagy egyszerűen vazokonstrikciót okoznak [27]. Így összességében a depolarizációval kapcsolatosan a vérátáramlás tovább mérséklődik, ezt nevezi a szakirodalom inverz neurovaszkuláris csatolásnak és ez a mechanizmus hozzájárulhat a szövet károsodásához stroke-ot követően [25,28]. Ha a szövet egymás után több depolarizáció hatásainak van kitéve, akkor az energiaszükséglet és energiakínálat közötti aránytalanság tovább mélyülhet, rontva a szövet túlélési esélyeit [29].

Célkitűzés

Tudjuk azt, hogy a kor előrehaladtával patkány modell esetén az ép agyszövetben az (káliummal történő) SD-k kiválthatósága csökken a fiatalokhoz képest [21]. Számos klinikai tanulmány megmutatta, hogy az iszkémia (vagy vérzés, trauma) során megfigyelhető SD-k gyakorisága és a velük kapcsolt inverz hemodinamikai változás szorosan korrelál a mortalitással és a neurológiai kimenetellel [27]. Azaz tudjuk, hogy idős korban kevesebb SD figyelhető meg normál körülmények között, az SD-k száma korrelál a neurológiai kimenetellel, de az idős korban mégis rosszabbak a kevesebb SD ellenére az életkilátások stroke-ot követően, illetve gyorsabban alakul az iszkémiás szövet infarktussá, mint fiatalokban [4]. Viszont egyetlen tanulmány sem vizsgálta még expliciten a kapcsolatot a depolarizációs események, a velük kapcsolt hemodinamikai változások és az életkor között.

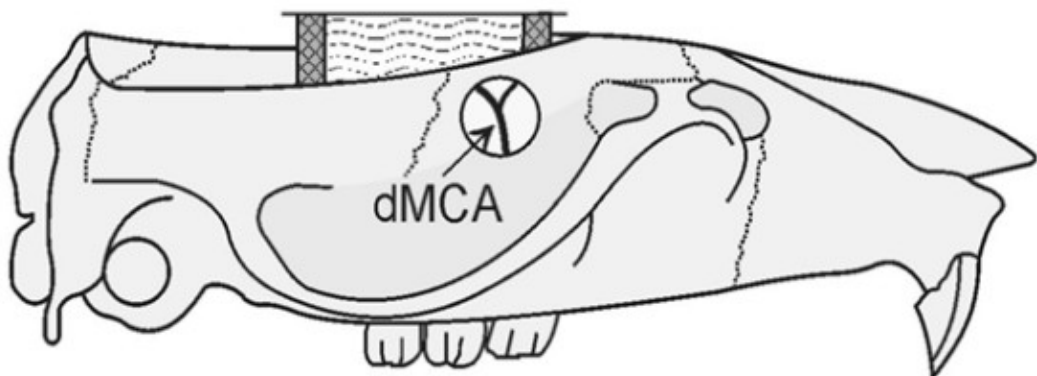
Azért, hogy ilyen jellegű vizsgálatokat lehetővé tegyünk, első célunk a laborunk által korábban kifejlesztett multimodális képalkotó eljárás kibővítése volt egy olyan programmal, amely képes nagy agykérgi területek depolarizációs jelenségeinek azonosítására és osztályozására karakterisztika alapján. Ezután arra kerestük a választ, hogy milyen depolarizációs jelenségek és kapcsolt vérátáramlás változások figyelhetők meg rövid, tranzienst arteria cerebri media okklúzió során fiatal, középidős és idős patkányokban. E célból méréseket végeztünk az arteria cerebri media ellátási területe felett a képalkotó rendszerünkkel, majd az általam készített új kiértékelő program segítségével analizáltuk a regisztrált jeleket.

Anyagok és módszerek

Műtéti protokoll

Műteteinket hím Wistar patkányokon végeztük, melyeket három csoportra osztottunk életkor szerint: fiatal (hat hetes életkor; $n=7$), középidős (9 hónapos életkor; $n=6$) és idős (2 éves életkor; $n=7$). A műtéteket halotán altatásban végeztük (1,5-2,5%), lélegeztetéshez N_2O és O_2 2:1 arányú keverékét használtuk, a patkányok a beavatkozás alatt spontán lélegeztek. A légúti nyákképződés elkerülése érdekében az állatoknak intramuszkulárisan atropint adtunk (0.05 ml), illetve testhőmérsékletüket egy fűtőpárna segítségével tartottuk állandó értéken ($37.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Az artériás középnyomás monitorizálása preparáltuk a farokartériát.

Az előkészítés során először a háton fekvő állatok nyakán középvonali metszést ejtettünk. Ezután felkerestük mindkét oldalon az arteria carotis communist, amit óvatosan elválasztottunk a környező lágyrészekről, ügyelve arra, hogy a nervus vagus rostjait is sérülésmentesen eltávolítsuk az erektől. Majd egy-egy fonállal aláöltöttünk az artériáknak mindkét oldalon.



1. Ábra: A műtéti előkészítés során elkészített koponyaablakok pozíciója

Az állatok koponyáját ezután (immár hason fekvő pozícióban) egy sztereotaxikus keretbe rögzítettük, majd a parietális kéreg fölött jobb oldalon egy koponyaablakot (megközelítőleg 4×4 mm méretben) készítettünk, megközelítőleg sagittálisan a parietális csont közepén, a középvarrattól kiindulva laterálisan. Emellett egy kisebb, második koponyaablakot (2×2 mm méretben) is létrehoztunk a halántékcsonton keresztül, az arteria cerebri media disztális szakasza felett. A koponyaablakok egy

vízhűtéses fogászati fúró (Technobox 810, Bien-Air Dental SA, Bienne, Svédország) segítségével készültek, mellyel fokozatosan elvékonyítottuk a koponyaacsontot egészen addig, míg áttetszővé nem vált, s óvatosan el nem lehetett választani a kemény agyhártyától. Ezután fogászati akrilát felhasználásával a felső koponyaablak köré gyűrű alakban gátat formáltunk úgy, hogy rajta egy be- és egy kifolyó cső számára nyílást is biztosítottunk. Az így létrejött üreget mesterséges cerebrospinális folyadékkal (aCSF) töltöttük fel, melynek összetétele a következő volt mM-ban kifejezve: 26.6 NaCl, 3KCl, 1.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 24.5 NaHCO₃⁻, 6.7 urea, 3.7 glükóz. Az állandó kémhatás fenntartása érdekében (pH=7,45) a folyadékot 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével folyamatosan buborékolattuk). Ezután nagy körültekintéssel eltávolítottuk az előzőleg szabaddá tett dura matert, végül a koponyaablakot egy üveg tárgylemez segítségével lefedtük, melyet a körkörös akrilát gáthoz kétkomponensű ragasztóval (UHU GmbH & Co, KG; Bühl, Németország) rögzítettük. Az így lezárt koponyaablakon egy perisztaltikus pumpa segítségével folyamatosan áramoltattuk az aCSF-et, 25μL/perc áramlási sebességgel.

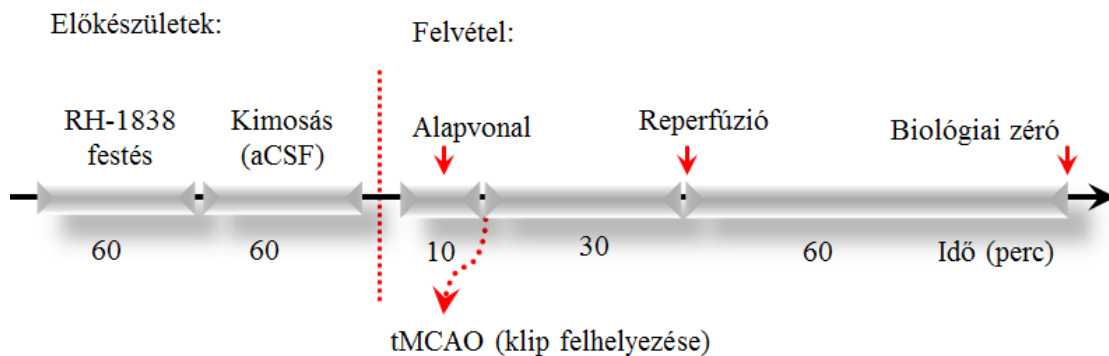
Az oldalsó koponyaablak kemény agyhártyáján csupán egy kis metszést ejtettünk, melyen keresztül a disztális arteria cerebri media eredése hozzáférhető vált későbbi leszorítás céljából. A halántékcsonthoz ablakot meleg aCSF-fel tartottuk nedvesen.

Kísérleti protokoll

A koponyaablakok elkészítése után a parietális ablakot feszültség-függő festékekkel (RH-1838, Optical Imaging Ltd., Rehovot, Izrael) töltöttük fel, mely az idegsejtek membránjához képes kötődni [30]. Először 1 órán át az aCSF-ben oldott feszültségfüggő festéket 80μl/perc sebességgel keringtettük a koponyaablakon keresztül, majd a nem kötött festék kiöblítésére további egy órán keresztül aCSF-et áramoltattunk ugyanúgy. A később részletezendő multimodális képalkotó eljárás megvalósítása érdekében a koponyaablak köré elhelyeztünk egy vörös és egy zöld diódát, egy lézer diódát és két CCD-kamerát.

Az optikai rendszer élesítése után indítottuk el a képrögzítést, először tíz perc alap rögzítésével. Ezután egy mikroaneurizma klipet (Sundt AVM Microclip, Codman) helyeztünk fel a halántékcsonthoz koponyaablakon keresztül az arteria cerebri media elérhető legproximalisabb szakaszára, ezzel tranziens arteria cerebri media okklúziót létrehozva (tMCAO). Közvetlenül ezután az előkészületek során a carotis

communisokon átvett fonalakat elhúztuk oldalra, ezáltal elzárva azokat. A fonalakat a sztereotaxikus kerethez rögzítettük. 30 perc okklúziós periódus felvétele után eltávolítottuk a klipet, illetve felengedtük az ereket. Ezután egy órán keresztül regisztráltuk a reperfúziós fázist, majd az állatok szívét 5mL levegő befecskendezésével (a farokartéria kanüljén keresztül) megállítottuk. Végül 10 perc úgy nevezett biológiai zéró került rögzítésre.



2. Ábra: A kísérleti protokoll

Multimodális képalkotó eljárás

A méréseinkhez használt többkomponensű képalkotó eljárást kutatócsoportunk fejlesztette ki korábban annak érdekében, hogy az agykérgi hemodinamikai és membránpotenciál változások nagy tér- és időbeli felbontással legyenek nyomon követhetők patkány modellben [31]. A mérőrendszer összeállítása főként spektroszkópai megfontolások alapján történt. Detektorunk két, monokromatikus, sztereomikroszkóppal (MZ12,5; Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) kapcsolt, teljesen azonos CCD kamera volt (1024×1024 pixel maximális felbontás; Pantera 1 M30, DALSA, Gröbenzell, Németország), melyekhez egy nyalábosztó (MZ12.5, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) segítségével csatoltuk be a sztereomikroszkóp fényét. A detektorok segítségével a koponyaablak felett különböző optikai gerjesztéseket használva párhuzamosan kérgi reflektancia, lézervolt interferencia, és fluoreszcencia méréseket végeztünk, a kamerákkal sorozatfelvételeket készítve.

Kérgi reflektancia mérések

Általánosságban elmondható, hogy a kérgi reflektanciamérések során alkalmasan megválasztott hullámhosszokon megvilágítjuk a koponyaablakot, majd a visszavert fény

intenzitását detektáljuk, annak időbeli változását követjük nyomon, úgy nevezett intrinsic optikai jeleket (IOS) detektálva. Az általunk alkalmazott rendszer két különböző hullámhosszú gerjesztést használ, melyekkel a következő hemodinamikai paramétereket monitorozni:

Teljes vértérfogat változása

Megfelelő hullámhosszúságú zöld fénnel (540-550 nm) gerjesztve egy keringési rendszert, mivel ezen a tartományon az oxigenált és a deoxigenált hemoglobin elnyelése közel megegyezik (ún. izobesztikus pont), a visszavert fény intenzitásából a teljes vértérfogatra lehet következtetni. Ezért az agyfelszín egy szűrőn (540-550 nm hullámhossz; 3RD620-640, Omega Optical Inc. Brattleboro, VT) átbocsátott zöld (530 nm centrális hullámhossz; SLS-0304-A, Mightex Systems, Pleasanton, CA) dióda fényével világítottuk meg minden másodpercben 100 ms hosszan. A dióda felvillanása alatt az első számú detektor végig (100 ms) exponált.

Deoxi-hemoglobin arány

Vörös fényt használva viszont, melynek hullámhossztartományában (620-640 nm) csak a deoxigenált hemoglobinnak van számottevő elnyelése, ennek arányára lehet következtetni. E célból vörös (LED; 625 nm centrális hullámhossz; SLS-0307_A, Mightex Systems, Pleasanton, CA) dióda fényével is megvilágítottuk a koponyaablakot minden másodpercben 100 ms időre, az első számú detektor pedig a megvilágítás alatt 10 ms hosszan exponálva készített sorozatfelvételeket. A LED fénye, hogy a mérés szempontjából legmegfelelőbb hullámhosszat tudjuk alkalmazni, egy excitációs filteren (620-640 nm hullámhossz, 3RD620-640, Omega Optical Inc. Brattleboro, VT) keresztül érte el a koponyaablakot.

Fluoreszcencia mérés

Vezérlés szempontjából némileg egyszerűsítette mérőrendszerünket, hogy az általunk használt feszültségfüggő festék gerjesztőfényül a fentebb már említett vörös dióda felvillanása szolgált. A festék, mint fentebb is olvasható, az idegsejtek membránjához kötődik, s fluoreszcencia intenzitása a transzmembrán potenciállal egyenesen arányosan, de ellentétes előjellel változik, azaz csökkenő membránpotenciálhoz növekvő fluoreszcenciaintenzitás tartozik. A gerjesztés ideje alatt a képeket a második számú detektor rögzítette (hiszen ugyanebben az időben az első

számú kamera a deoxigenált hemoglobin arányát monitorozta), melyet a gerjesztőfény kiszűrésére egy emissziós filterrel (3RD 670-740 emissziós filter; Omega Optical Inc.) láttunk el. Az expozíciós idő a teljes gerjesztés ideje volt, azaz 100 ms.

Lézerfolt interferencia mérés

Végül pedig egy, a fluoreszcencia- és reflektanciatarományon kívül eső hullámhosszú lézerdiódát (Sanyo DL7140-201S; 70mW; 736 nm emissziós hullámhossz) használva lézerfolt interferencia méréseket végeztünk az agyi vérátáramlás (CBF) mérésére. A megvilágítási idő ebben az esetben 20 ms volt minden másodpercben. A dióda áramát a megvilágítás alatt egy vezérlőberendezés (ITC502, Thorlabs Ltd., Cambridge, Egyesült Királyság) tartotta állandó (100 mA) értéken. Az expozíciót az első számú detektor végezte, a teljes megvilágítás (20 ms) alatt. A nyers képekből egy, a laborunk korábban által tervezett algoritmus készítette el a vérátáramlási térképeket az Image Pro Plus (Media Cybernetics UK, Marlaow, Egyesült Királyság) nevű program segítségével [32].

Szinkronizáció

Mint a fentiekből kiolvasható, minden gerjesztés (vörös, zöld, lézerdióda) minden másodpercben felvillant egyszer (azaz 1 Hz frekvenciával), mialatt a CCD-kamerák a fentebb részletezett expozíciós időkkel sorozatfelvételeket készítettek. Azaz minden detektált jelhez (agyai vértérfogat, deoxi-hemoglobin arány, feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitása, agyi vérátáramlás) egy monokromatikus képsorozat tartozik, melyek pixeleinek szürke szintjei felelnek meg egy-egy agyterület megfelelő modalitásbeli adott időponthoz tartozó értékének. A szinkronizációért felelős számítógép (Metrabyte DAS-20) feladatait az ASYST Macmillan program (Keithley Instruments Inc., Reading, Egyesült Királyság) segítségével hajtotta végre.

Méréstechnikai megjegyzések

A monokromatikus CCD-kamerák maximális felbontása 1024×1024 volt, de ezt mérés technikai megfontolások alapján nem használtuk ki mindkét kamera esetén. Az első számú detektorral a felvételek rögzítése a maximális felbontás mellett történt azért, mert a lézerfolt interferencia mérések esetén ideális esetben a foltok mérete közel megegyezik a kamera pixelméretével, amely feltételnek az elérhető legmagasabb felbontás esetén eleget tudtunk tenni. A második számú kamera esetén, amely csak a

feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitását detektálta, 2×2 -es úgy nevezett binning módot alkalmaztunk (azaz 4 szomszédos pixelt egy pixelként olvastattunk ki a chipből), amivel a mérés jel/zaj viszonyát javítottuk. A kiolvasás után, azért, hogy a két kamera képpontjai összehasonlíthatók legyenek, az első kamera képét is 512×512 -es felbontásúra konvertáltuk. Fontos megemlíteni, hogy noha a sztereomikroszkóp használata miatt a két kamera képe nem feleltethető meg tökéletesen egymásnak, a kicsiny eltérés miatt ezt vizsgálataink során elhanyagoltunk.

A mikroszkóp nagyítása 3,15-szörös volt, a vizsgált terület nagysága pedig így $3,8 \times 3,8 \text{ mm}^2$ -esnek adódott, vagyis 512×512 -es felbontás mellett egy pixel $7,42 \times 7,42 \text{ }\mu\text{m}^2$ -es kéregrészletnek feleltethető meg.

Mivel mérőrendszerünk képes mind a deoxigenált és az oxigenált hemoglobin együttes, mind a deoxigenált hemoglobin külön történő monitorizálására, ezért jogosan merülhet fel a kérdés, hogy ezt miért nem használjuk fel az általunk használt kéregrészlet szaturációjának meghatározására. A mérések során abszolút értelemben vett kalibrálás nem történik, nem határozzuk meg a hemoglobin koncentrációját, azaz mi csak relatív változásokat detektálunk. Továbbá nem ismerjük az általunk vizsgált szövetréteg abszorpciós koefficiensét, illetve annak hullámhosszfüggését, így csupán a mérőrendszer jelentős kiterjesztésével, további spektroszkópai mérésekkel (kalibrálással) tudnánk a szaturáció számszerű értékét meghatározni, a jelenlegi felépítés ehhez nem elegendő.

Jelanalízis

A mérőrendszer által rögzített monokromatikus képsorozatok megfeleltethetők sorrendben a piros, zöld IOS-, agyi vérátáramlás- és feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitásgörbék két dimenziós pillanatfelvételeinek, melyek segítségével az adott jelek időbeli változása nyomon követhető. A sztereotaxiás rögzítés miatt jó közelítéssel minden egyes kép egy adott pixele ugyanannak az agyfelszíni területnek a változását követi nyomon a különböző modalitásokban.

Egy-pont analízis

Először a laborunk által már korábban is alkalmazott módon azonosítottuk a depolarizációs jelenségeket, illetve megállapítottuk, hogyan kapcsolnak ezen SD-k a véráramlással [31,32]. Ehhez egyfelől a feszültségfüggő képekből összefűzött videókon

azonosítottuk az SD-eket, mint pozitív fluoreszcencia változásokat (hiszen csökkenő membránpotenciállal a festék intenzitása nő), melyek végighaladnak a koponyaablak területén [30]. Minden detektált esemény sebességét, alakját és terjedési irányát meghatároztuk. Másfelől a rögzített képeken lehetőleg minden patkány esetén megközelítőleg ugyanazon anatómiai terület felett egy kis területet (3×3 pixel) választottunk ki, melyeken végigkövettük a különböző modalitásokban (feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitás-, CBF- és zöld IOS jel) a szürke szintek változásait a mérési periódus alatt. A depolarizációkat transziens depolarizációkként azonosítottuk, ha a feszültségfüggő jel az intenzitásnövekedés után 200 másodpercen belül visszatért az eredeti értékre, máskülönben elnyújtott depolarizációnak címkéztük. A zöld IOS jelek analízise is megtörtént, melyen a transziens depolarizációk esetén egy gyors, negatív irányú kitérés látható, amit egy lassabb, pozitív irányú kitérés követ lassú visszatéréssel, azaz a válasz bifázisos. Megnyúlt depolarizációk esetén a zöld jelen is látható egy gyors eltolódás, amit nem követ visszatérés.

Emellett meghatároztuk, hogy az adott pontban a depolarizációk időpontjában (aktuális CBF) milyen hemodinamikai válasz (csatolás) figyelhető meg, amit százalékos értékben fejeztünk ki (relatív CBF) a következő módon: a 10 perc biológia zéró átlagértékét kivonva a jelből, a mérés kezdetekor felvett első 30 másodperc átlagértékét 100 százaléknak (alap CBF) véve relatív vérátáramlás változássá számoltuk a mérési adatokat, azaz:

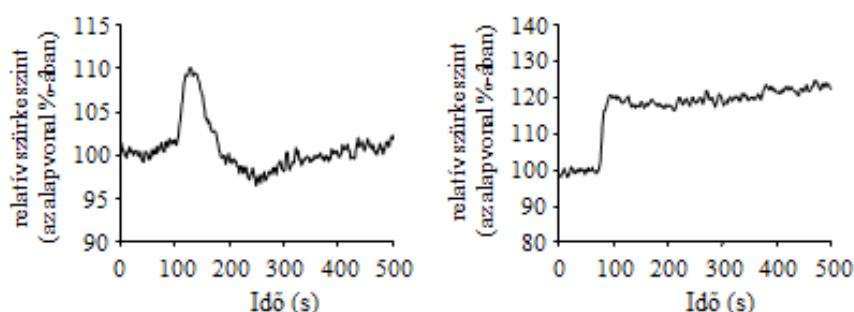
$$relatív\ CBF = \frac{aktuális\ CBF}{alap\ CBF} \ .$$

Az egy-pont analízist az ImagePro Plus 5.1 (Media Cybernetics) program segítségével hajtottuk végre.

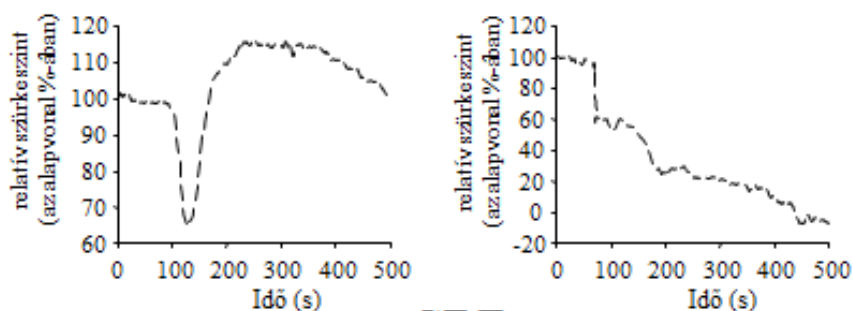
Tranziens SD

Megnyúlt SD

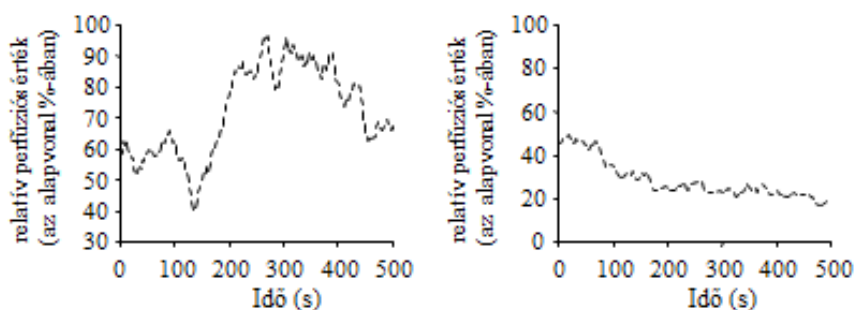
Feszültségfüggő jel



Zöld IOS



CBF



3. Ábra: A tranziens és megnyúlt depolarizációk tipikus képe egy-pont analízis során vagy a referenciapontokban a különböző modalitásokban

Teljes-ablak analízis

Az analízis során először elkészítettük az agyi vérátáramlás és potenciálváltozás tér-időbeli térképeit, melyeket az eredeti képsorozatokból a nagyobb, látható erek eltávolításával nyertünk. Ez minden esetben az első zöld IOS kép segítségével történt, mert ez az a modalitás, amelyen a leginkább megítélhető az agyfelszín erezete (azaz itt

különül el legkontrasztosabban az ereket és a parenchyma). Többnyire az erek intenzitása néhány nagyságrenddel a parenchyma intenzitása alatt marad, ezért minden képpont, amelynek az első zöld képen az intenzitásértéke az átlagintenzitás 100-120%-a alatt volt, eltávolításra került, megkapva az érmentes agyfelszín pixeleit. A küszöbszázalék meghatározása minden patkány esetén manuálisan történt, hiszen az ér-parenchyma arány különbözőt patkányról patkányra és a lehető legtöbb ér eltávolítása mellett igyekeztünk megőrizni az érmentes parenchyma lehető legnagyobb részét. Majd tér-(5×5-ös normált átlagolómaszk) és időbeli (aluláteresztő szűrő, 150 másodperc hosszú mozgóátlag háromszori végigfuttatása) szűrést végezve redukáltuk a mérés zaját.



4. Ábra: Az ábrán a teljes-ablak analízis bevezető lépései láthatók, ahogy a regisztrátum első zöld képe (felső kép) alapján a program segítségével kiválasztjuk az érmentes agyfelszínt. Először megkeressük a küszöbintenzitás alatti pontok pozícióit (középen, feketével), majd ezen pontokat kizárjuk az analízisből, megtartjuk az érmentes agyszövet pontjai (alul). A küszöbérték meghatározása minden patkány esetén vizuálisan történt.

Azért, hogy a pixelek idősorainak automatikus analízisét lehetővé tegyük, először az érmentes agyfelszín véletlenszerűen választott pixeleinek feszültségfüggő festék fluoreszcencia intenzitás-, CBF- és zöld IOS jelét manuálisan kiértékeljük minden patkány esetén három különböző pontban, melyek később az analízis referenciapontjaiul szolgáltak. A referenciapontok analízise teljes mértékben megfelel a fentebb leírt egy-pont analízisnek.

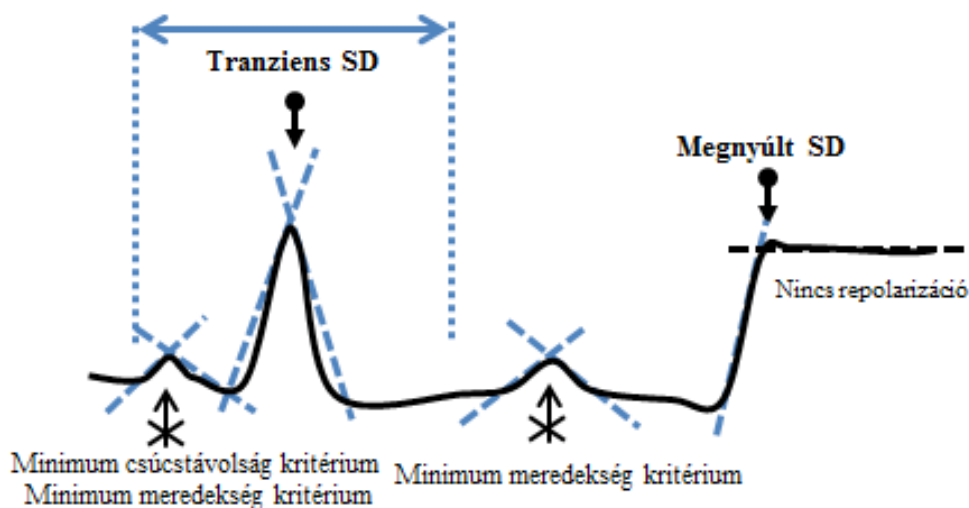
A cél olyan program készítése volt, amely a koponyaablakon keresztül látható agyfelszín teljes területén, minden pixel esetén képes az ott megfigyelhető összes depolarizációs jelenségek azonosítására és osztályozására. Ezért a referenciapontok elemzése alapján olyan kritériumrendszert állítottunk fel, melynek segítségével az általam írt program a referenciapontokban minden esetben a manuális analízissel tökéletesen egyező eredményt ad. Az egy-pont analízisnél már leírtakkal összhangban az találtuk, hogy VS-jeleken kétféle jól megkülönböztethető depolarizációs kinetika figyelhető meg, melyek minden esetben nemcsak az idősorokon, hanem a képekből összefűzött videókban is jól látszódnak.

A tranziens kúszó depolarizációk a feszültségfüggő festék jelen egy 80-100 másodperc hosszú depolarizációs-repolarizációs jelenséggé azonosíthatók, melyek minden esetben együtt járnak egy bifázisos, hurokszerű változással a zöld jelen is. Ez a párhuzamos változás, mint a későbbiekben látni fogjuk, nagyon jól felhasználható az automatikus analízis segítségével talált áldepolarizációk kiszűrésére, ami nagyban növeli a módszer specificitását.

Az elnyújtott kúszó depolarizációk hirtelen, meredek potenciálváltozásként ismerhetők fel, melyeket megközelítőleg konstans potenciálú szakasz követ és nem figyelhető meg repolarizáció legalább 200 másodpercig, nagyon gyakran pedig egyáltalán nem is áll helyre az adott terület potenciálja. Az elnyújtott kúszó kérgi depolarizációkat megfigyeléseink szerint az okklúzió ideje alatt egyetlen esetben sem követte újabb depolarizációs jelenség.

A kiértékelés során minden egyes pixel feszültségfüggő jelének idősorán megkerestük az összes lokális maximumot, mint lehetséges depolarizációs csúcsokat. Azt tapasztaltuk és ezt a szakirodalom is alátámasztja [33], hogy a tranziens kúszó kérgi depolarizációs jelenségeket követően megfigyelhető egy körülbelül 2 perc hosszúságú abszolút refrakterperiódus, ezért minden lokális maximumot, amely egy nagyobb

szélsőérték közvetlen környezetében volt, kizártuk az analízisből (minimum csúcstávolság kritérium). Ezután a szélsőértékek környezetében vizsgáltuk a jel meredekségét úgy, hogy a minimum csúcstávolságon belül megkerestük a lokális maximumhoz legközelebb eső, azt megelőző és követő lokális minimumokat. Feltételezve azt, hogy a depolarizáció és a repolarizáció alatt a növekedés és csökkenés lineáris, meghatároztuk az így talált lokális minimumokon átmenő, a maximumon keresztül húzott egyenesek meredekségét, melyre a referenciapontok segítségével egy küszöbértéket határoztunk meg (minimum meredekség kritérium). Azon maximumokat, melyeknek de- és repolarizációja kellően meredek és a zöld jelen ezen szélsőértékekkel közel egyidőben megfigyelhető egy bifázisos változás, tranziens depolarizációként azonosítottuk.



5. Ábra: A depolarizációkereső algoritmus működése elve sematikusán. Első lépésként a program megtalálta a lokális maximumokat (nyilakkal jelölve), majd a szelektálás során kizárta az első csúcsot, hiszen a minimum csúcstávolságon belül helyezkedett el egy nagyobb csúcshoz. A második csúcs megfelelt minden kritériumnak, így tranziens SD-ként lett címkézve. A harmadik maximum meredeksége küszöbérték alatti volt, ahogy a negyediké is. Utóbbi viszont nem is tért vissza a depolarizáció után, így megnyúlt SD-ként azonosítható.

A feszültségfüggő jel utolsó megtalált tranziens depolarizációja után (ha egyáltalán nem is volt, akkor a jel első másodpercétől kezdve) megvizsgáltuk a jel lokális maximumait, hogy eleget tesznek-e a megnyúlt depolarizáció kritériumainak. Ez a fajta eljárás azért indokolt, mert az egy-pont analízisek során azt találtuk, hogy a megnyúlt depolarizációkat sosem követi sem tranziens, sem újabb megnyúlt esemény, azaz megnyúlt depolarizációt csak olyan jelen (vagy jelszakaszon) érdemes keresni, ahol

tranzien depolarizáció már nem vagy egyáltalán nem található. A referenciapontokban látott karakterisztikának megfelelően a megnyúlt depolarizációk is hasonló meredekséggel érnek fel a maximumig (minimum meredekség kritérium), majd pedig legalább 200 másodpercig kicsiny szórással a maximum érték szintjén maradnak (stabilitás kritérium). Ha egy maximum eleget tett a kritériumok mindegyikének, akkor megnyúlt depolarizációként azonosítottuk.

Az agyi vérátáramlási térképek a lézer speckle képek alapján készültek, ugyanazon pixeleket megtartva, melyeket a feszültségfüggő festék jelének analízisekor is használtunk. A jelek tér- (5×5 -ös normált átlagolómaszk) és időbeli (3 másodperces mozgóátlag) szűrése után a 10 perc biológia zero átlagértékét nulla, a mérés kezdetekor felvett első 30 másodperc átlagértékét 100 százaléknak véve relatív vérátáramlás változássá számoltuk a mérési adatokat (ahogyan az egy-pont analízis esetén is történt). Ezután meghatároztuk minden egyes pixel esetén az okklúzió utáni első harminc másodperc, illetve közvetlenül a klip levétele előtti harminc másodperc átlagértékét, hogy információt nyerjünk arról, hogyan változott a koponyaablak vérátáramlása az okklúzió közel 30 perce alatt. A pixelekhez tartozó százalékos értékeket ezután nagyság szerint 7 csoportba osztottuk aszerint, hogy a vérátáramlás az okklúzió kezdetekor és a végén a kezdeti vérátáramlás (az alapvonal) hány százaléka volt: 0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50% vagy >60%.

A feszültségfüggő festék jeléhez nagyon hasonló módon történt az agyi vérátáramlási térképek zajszűrése, azzal a nem elhanyagolható különbséggel, hogy itt nem volt szükség olyan széles intervallumú csúszó átlagok használatára, hiszen nem események, csúcsok azonosítása és osztályozása történt, hanem rövid időbeli átlagértékek meghatározása. Ebben az esetben nemcsak hogy felesleges, hanem káros nagyobb intervallumokon átlagolni, hiszen az időbeli felbontást ez jelentősen csökkenti.

A fentebb leírt teljes-ablak analízis összes programozási feladatát MATLAB (R2012a, The MathWorks, Inc.) környezetben valósítottam meg.

Statisztika

A statisztikai kiértékeléseket az SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc.) program segítségével végeztük. A megadott értékek $\text{átlag} \pm \text{szórás}$ vagy $\text{átlag} \pm \text{standard hiba}$ formában vannak megadva (attól függően, hogy az adott adatokra melyik volt alkalmasabb), a nemparaméteres értékek (a kúszó depolarizációs jelenségek

teljes száma) esetén pedig medián és kvartilisek szerepelnek. A kúszó depolarizációk teljes számának összehasonlítása a csoportok között Kruskal-Wallis-féle varianciaanalízissel történt, a csoportok egymással történő összehasonlítását Student-Newman-Keuls post hoc teszttel végeztük.

A tranziens és a megnyúlt kúszó kérgi depolarizációk relatív területét egy-utas ANOVA-val hasonlítottuk össze a csoportok között, majd Fisher-féle legkisebb szignifikáns differencia (LSD) post hoc tesztet végeztünk. A kezdeti és végső vérátáramlási értékek csoportok közötti összehasonlítására ismételt-méréses ANOVA-t alkalmaztunk, amit LSD post hoc teszt követett. A tranziens és megnyúlt kúszó depolarizációk relatív területe és a súlyosan iszkémiás agyterület közötti kapcsolatot Pearson-féle lineáris korrelációs teszttel kerestük.

Az elfogadott szignifikancia szint $p < 0,05$ volt és a szignifikancia szinteket a következőképpen jelöltük minden analízis esetén: * $p < 0.05$ és ** $p < 0.01$.

Eredmények

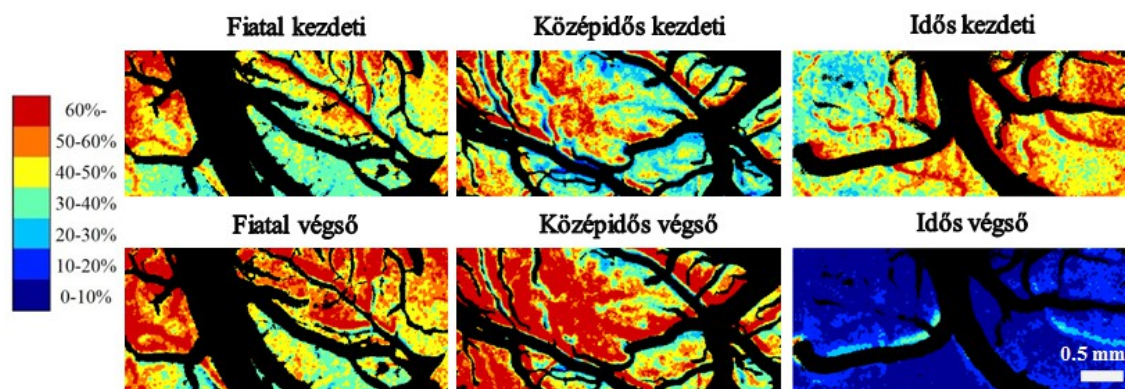
Új analízis

Fontos, önálló új eredménynek tekinthető, hogy sikerült olyan algoritmust kidolgoznom, amely a koponyaablak minden pontjában képes a többi ponttól független analízisre, azaz gyakorlatilag létrejöhetett a mérési adatok új, az eddigiekhez képest nagyságrendekkel több pontban történő szimultán analízise.

Vérátáramlás változások tMCAO alatt

CBF (az alap %-a)	Fiatal		Középidős		Idős	
	kezdeti (terület%)	végso (terület%)	kezdeti (terület%)	végso (terület%)	kezdeti (terület%)	végso (terület%)
0-10	0.5±1.1	0.006±0.01*	1.0±2.3	0.04±0.08*	0.63±1.3	16.1±23.9
10-20	8.7±13.2	0.64±1.0*	12.6±18.4	1.5±3.1*	13.8±21.6	33.6±26.0
20-30	18.5±14.3	9.9±14.1	13.5±15.0	7.8±7.9	13.3±15.2	16.9±19.0
30-40	25.6±8.6	20.2±11.7	12.7±9.6	14.7±9.2	11.05±10.9	7.7±8.4
40-50	20.0±8.6	21.4±8.7	14.4±8.4	17.3±6.9	13.9±10.8	6.6±8.3
50-60	12.7±7.5	16.5±6.6	15.5±9.6	18.1±6.3	15.3±10.7	5.7±7.3
60-	16.0±12.5*	33.5±24.6**	30.3±24.4	40.6±18.6**	32.0±32.3	13.3±25.1

1. Táblázat: Vérátáramlási értékek korcsoportonként a tMCAO kezdetén és végén, az alapvonal százalékában kifejezve



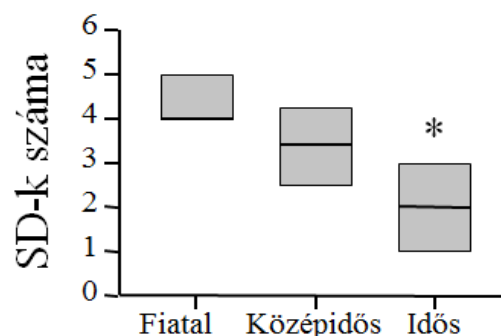
6. Ábra: Reprezentatív hamis színes vérátáramlási térképek minden korcsoportból a tMCAO kezdetén és végén

Fiatal patkányok esetén a közvetlenül a tMCAO kiváltása utáni vérátáramlási értékek a perfúziós tartományok között egyenlően oszlottak meg, kivéve a 10% alatti értékeket, amely alig volt megfigyelhető. Meglepő, de a jól perfundált (>60% perfúzió) területek aránya szignifikánsan nagyobb az okklúzió kezdetén középidős és idős patkányok ($30.3 \pm 24.4\%$ és $32.0 \pm 32.3\%$) esetén, mint fiatalokban ($16.0 \pm 12.5\%$), illetve korcsoporton belül is magasabbnak találtuk a többi perfúziós tartományhoz képest.

Méréseink alapján elmondható, hogy a perfúziós mintázat az iszkémiás periódus végére újrarendeződött. Amíg a fiatal és középidős csoportban a jól perfundált terület aránya emelkedett ($33.5 \pm 24.6\%$ és $40.6 \pm 18.6\%$), addig idős patkányokon ez a tartomány jelentősen csökkent ($13.3 \pm 25.1\%$). Ezzel párhuzamosan a rosszul perfundált (10-20%) terület fiatalokban ($8.7 \pm 13.2\%$ -ról $0.64 \pm 1.0\%$ -ra) és középidősekben ($12.6 \pm 18.4\%$ -ról $1.5 \pm 3.1\%$ -ra) beszűkült, míg idősekben kiterjedt ($13.8 \pm 21.6\%$ -ról $33.6 \pm 26.0\%$ -ra). Az iszkémia által leginkább sújtott terület nagysága (<10%) fiatalokban és középidősekben gyakorlatilag eltűnt ($0.006 \pm 0.01\%$ és $0.04 \pm 0.08\%$), idősekben pedig jelentősen kiterjedt ($16.1 \pm 23.9\%$).

A tranziens és megnyúlt SD-k gyakorisága és térbeli kiterjedése

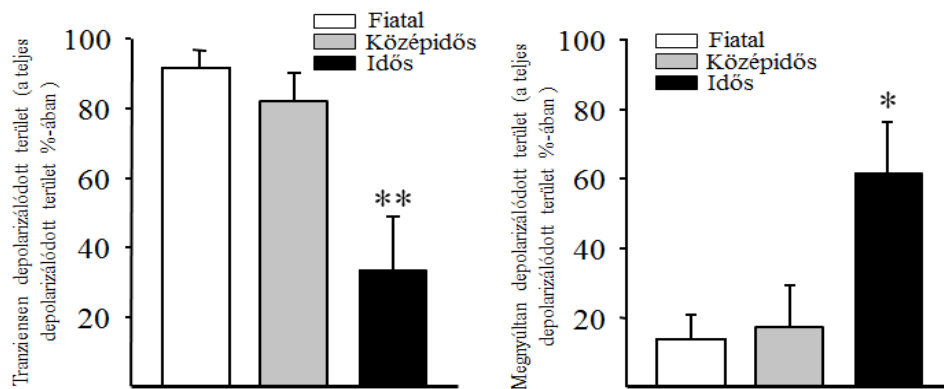
Összeszámoltuk, hogy a mérések során hány SD-t regisztráltunk a különböző korcsoportokban állatonként. Azt találtuk, hogy fiatal ($q_1 = 4$, medián=4, $q_3 = 4.75$) és középidős ($q_1 = 3$, medián=3.5, $q_3 = 4$) patkányokban szignifikánsan több SD figyelhető meg, mint idősekben ($q_1 = 1$, medián=2, $q_3 = 2.75$) a 30 perc okklúziós periódus alatt. Összesen 62 SD-t sikerült rögzítünk méréseink során, melyek közül 55 SD az okklúzió alatt fejlődött ki, s csupán 7 SD esett a reperfúzió idejére.



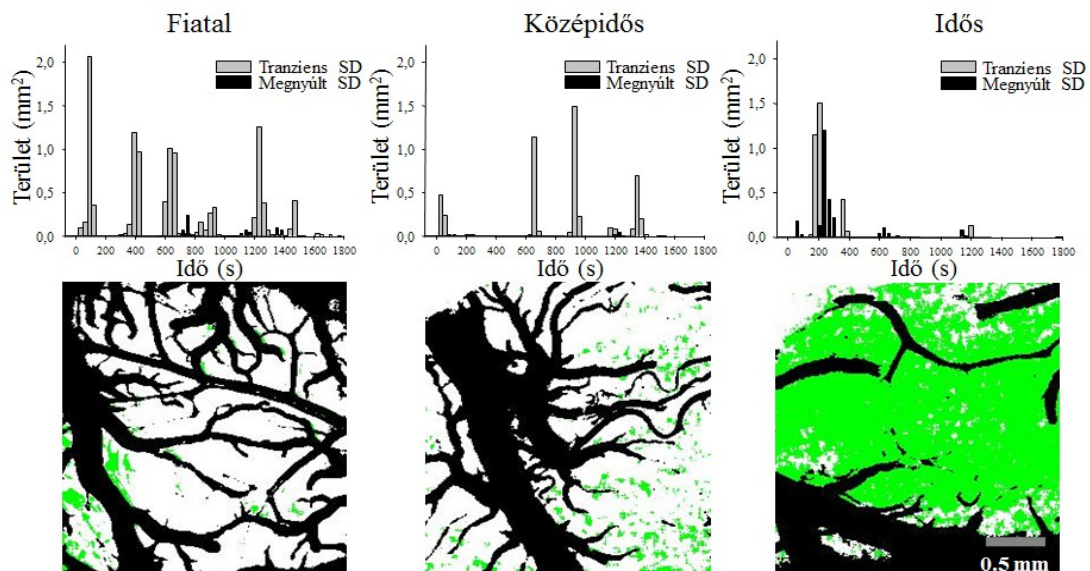
7. Ábra: Az SD-k átlagos száma korcsoportonként

Meghatároztuk azon területek arányát, ahol tranziens vagy megnyúlt

depolarizáció megfigyelhető volt az iszkémia során. Azt találtuk, hogy ebből a szempontból a korcsoportok között nem figyelhető meg jelentős különbség (fiatal: $98 \pm 2\%$; középidős: $87 \pm 15\%$; idős: $87 \pm 15\%$), azaz nagyjából ugyanakkora terület vett részt a depolarizációk terjedésében mindegyik esetben. Viszont, ha különbséget teszünk tranziens és megnyúlt depolarizációk között, akkor azt találjuk, hogy jóval nagyobb terület depolarizálódik tranziensen fiatalok ($91 \pm 5\%$) és középidősek ($82 \pm 8\%$) esetén, mint idősokban ($34 \pm 15\%$). Ezzel párhuzamosan pedig megnyúlt depolarizáció szignifikánsan nagyobb területen fejlődik ki idősokban ($62 \pm 15\%$), mint fiatalokban ($14 \pm 7\%$) vagy középidősekben ($17 \pm 12\%$).



8. Ábra: A tranziensen vagy megnyúltan depolarizálódott területek a teljes terület százalékában kifejezve



9. Ábra: Felül: Reprezentatív hisztogramok korcsoportonként egy patkányból, melyek a 30 másodpercenként összegzett tranziens és megnyúlt depolarizációk számát mutatják. Alul: Ugyanezen patkányokban megfigyelt megnyúltan depolarizálódó agyterületeit (pixeleit) jelöltük zölddel.

Kapcsolat az SD típusa és a hemodinamikai válasz között

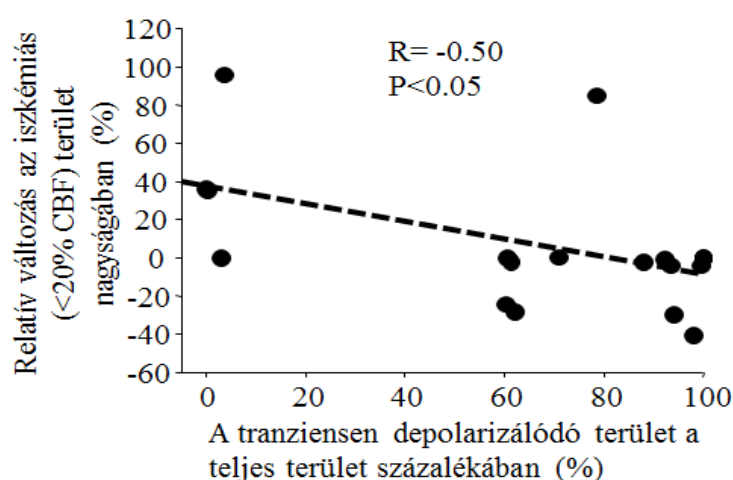
Az egy-pont analízisek során elemzett területen (minden patkány esetén megközelítőleg ugyanazon agykérgi részlet felett) közel ugyanannyi depolarizációs eseményt láttunk, mint a teljes-ablak analízis során (azaz a legtöbb esemény áthaladt a kiválasztott ponton is). Az egy-pont analízis során észlelt tranziens SD-k (n=49) legnagyobb része hiperémiával kapcsolatos jelentkezett (n=36) vagy vérátáramlás változás nélkül (n=12), s csupán egyetlen esetben figyeltünk meg inverz csatolást (n=1). A megnyúlt depolarizációk minden esetben hipoperfúzióval jártak. Korcsoportok közötti különbség is mutatkozott, a fiatal és középidős patkányok esetén a megfigyelt események legnagyobb része nem járt az áramlás redukciójával (fiatal: 28-ból 26 esemény; középidős: 18-ból 16), míg idősokban a megfigyelt 13 eseményből 7 volt inverzen csatolt.

Fiatal		
Megnyúlt SD (n=2)	CBF-csökkenés	-22.2±15.7% (n=2)
Tranziens SD (n=26)	nincs CBF-változás	n=5
	CBF-növekedés	34.5±13.8 % (n=21)
Középidős		
Megnyúlt SD (n=1)	CBF-csökkenés	-30.0% (n=1)
Tranziens SD (n=17)	CBF-csökkenés	-17.2% (n=1)
	nincs CBF-változás	n=4
	CBF-növekedés	41.2±17.1 % (n=12)
Idős		
Megnyúlt SD (n=7)	CBF-csökkenés	-32.7±11.1% (n=7)
Tranziens SD (n=6)	nincs CBF-változás	n=3
	CBF-növekedés	27.0±12.0 % (n=3)

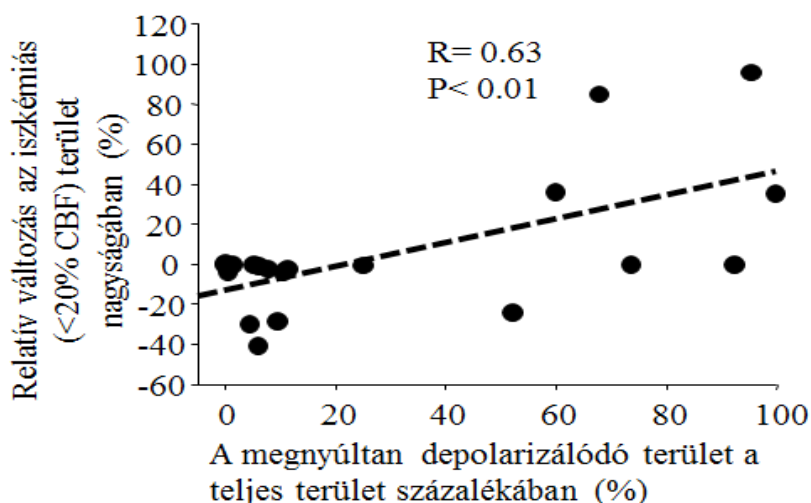
2. Táblázat: A megfigyelt depolarizációk és a velük kapcsolt vérátáramlási változás az alapvonalhoz viszonyítva

Kapcsolat az SD típusa és a súlyosan iszkémiás terület nagysága között

Összehasonlítva a megnyúlt SD-k relatív területét a súlyosan iszkémiás terület relatív nagyságával a tMCAO végén, szignifikáns pozitív korrelációt ($P < 0.01$) találtunk. Azon területeket tekintettük súlyosan iszkémiásnak, ahol a vérátáramlás az alapvonal vérátáramlási értékének 20%-a alatt volt az adott időintervallumban. A tranziens SD-k relatív területét hasonlítva viszont ugyanezen területhez, inverz kapcsolatot találtunk ($P < 0.05$). Összességében elmondható, hogy ha a koponyaablak felett tranziens eseményeket regisztráltunk, akkor a klippelés utáni értékhez képest a vérátáramlás növekedett az okklúzió végére, míg megnyúlt depolarizáció esetén az iszkémia mélyült ugyanekkor.



10. Ábra: A súlyosan iszkémiás terület nagyságának változása a tranziensen depolarizálódott terület nagyságának függvényében



11. Ábra: A súlyosan iszkémiás terület nagyságának változása a megnyúltan depolarizálódott terület nagyságának függvényében

Megbeszélés

Új analízis

Korábban a laborunk munkatársai által kifejlesztett multimodális képalkotó eljárás, noha potenciálisan képes volt a teljes koponyaablak eseményeinek detektálására [31,32], ez nagyrészt kihasználatlan maradt kellő kapacitás hiányában.

Rendszerünk meglehetősen jó tér- és időbeli felbontással képes az agykéreg felett mérésre, amivel bizonyos aspektusaiban megelőzi az áramlásmérés és potenciálmérés arany standardjainak tekinthető lézer Doppler áramlásmérést és kérgi elektródával történő potenciálméréseket. Módszerünk igazán nagy előnye az, hogy pontosan ugyanabban a pontban képesek vagyunk egy időben detektálni a különböző modalitások változásait, mindezt igen nagy területen, míg a fentebb említett mérőeszközök egy-pont méréseket képesek végezni, s az áramlásmérés tipikus elrendezés esetén nem is azokban a pontokban történik, ahol a potenciálmérés.

Viszont a CCD-detektorok által adott nagy térbeli felbontás csak olyan formában képezte a rendszer előnyét, hogy a mérések elvégzése után szabadon választhattuk meg a kiértékelni kívánt mérési ponto(ka)t. Az ésszerű határok között elemezhető pontok számát viszont behatárolta a tény, hogy minden pont esetén az időigényes analízist manuálisan kellett kivitelezni, azaz az elméletileg rendelkezésre álló 512^2 mérési pont közül csak néhányat értékeltük ki valójában. Igaz, ezen pontok megválasztásában igen nagy szabadság állt rendelkezésünkre. Továbbá a két dimenziós képek segítségével a kúszó kérgi depolarizációs jelenségek terjedési mintázata is jellemezhető és osztályozható típus, gyakoriság, terjedési sebesség, irány szerint. Azonban a néhány önkényesen választott pont kiértékelése miatt a térbeli trendek és vérátáramlással való kapcsoltság leírásából nem lehetett általános következtetéseket levonni a koponyaablak vagy az iszkémia teljes területére és nem lehetett pontos, összehasonlító térbeli elemzéseket végezni csoportok között, bizonyos szempontból megmaradva az egy-pont-analízisek szintjén.

Ezért különös fontosságú a jelen fejlesztés, ami lehetővé teszi, hogy a mérőrendszerben rejlő potenciált kiaknázzuk. Segítségével a koponyaablak teljes területén minden pixelnek megfelelő terület külön analizálható, az egyes képpontok különböző modalitásai összevethetővé válnak egymással, és a többi képponttal

ugyanúgy. Emellett a tér- és időbeli trendek nagyon pontos nyomon követése, számszerű leírása lehetővé válik, ami különböző csoportok közötti összehasonlításra is lehetőséget biztosít. Ez egyfelől későbbi kísérletek tervezésénél nyújt nagyobb szabadságot, másfelől a fent részletezett kísérletsorozat nagy pontosságú kiértékelése is megtörténhetett.

Az öregedés hatása

Munkacsoportunknak először sikerült kimutatni azt, hogy az öregedő patkányok agya iszkémiára (1) kevesebb, de gyakran megnyúlt kúszó depolarizációt generál összehasonlítva a fiatal és középidős állatokkal, (2) a megnyúlt kúszó depolarizációk száma korrelál az iszkémia progressziójával. Ezen megfigyelések korfüggése valószínű, hiszen a középidős patkányok mind az idős, mind a fiatal patkányokra jellemző karakterisztikát mutattak.

Tudjuk azt, hogy a kor előrehaladtával az SD-k kiválthatósága csökken, ugyanolyan mértékű stimulus (kálium csepegtetése az agyfelszínre) idősebb patkányokban kevesebb depolarizációt okoz, mint fiatalokban [21]. Ezt a korral történő változást emberekben is kimutatták traumás agysérülések után, fiatal páciensekben sokkal gyakrabban fordultak elő SD-k, mint idős betegekben [34]. A jelenség magyarázata sokrétű, kapcsolatban állhat azzal, hogy idősökben a gliasejtekhez viszonyítva relatívan kevesebb neuron található és az SD-k kiválthatósága ott a legjobb, ahol a legnagyobb a neuronok aránya [35,36,37]. Továbbá a korral csökken a feszültségérzékeny ioncsatornák száma és aktivitása, illetve az extracelluláris tér nagysága is kiterjed [20,38].

Kiterjedtebb megnyúltan depolarizálódó területek idősökben

Idősökben nagyon gyakran láttuk azt, hogy az agyszövet már az okklúzió kezdete után nem sokkal depolarizálódik, melyeket teljes-ablak analízisünk megnyúlt depolarizációként címkézett, viszont az egy-pont analízisek azt sugallják, hogy ezen események nemcsak hogy elnyújtott repolarizációs kinetikát mutatnak, hanem többnyire terminálisak is (legalábbis abban az értelemben, hogy a reperfüzió kezdetéig nem rendeződik a potenciál). Ezzel összhangban egyetlen esetben sem figyeltünk meg újabb depolarizációs eseményt az okklúzió ideje alatt elnyújtott depolarizációt követően.

Fiatalabb patkányok esetén csak kis területeken észleltünk elnyújtott depolarizációkat, ami arra utal, hogy az agyszövet még képes repolarizálódni.

Idősekben viszont a kiterjedt megnyúltan depolarizálódó területek utalhatnak a rendelkezésre álló energia csökkenésére, vagy a repolarizációért felelős ionpumpák csökkent funkciójára, ami a neurovaszkuláris egység inverz kapcsoltsága miatt tovább rontja a szövet energia- és oxigénellátását, egyfajta ördögi körbe kényszerítve az agyszövetet [23].

Az iszkémia talaján kialakuló stroke, amint azt már a bevezetőben is említettük, az egyik vezető halálok, és noha minden életkorban előfordul, leginkább az idősök veszélyeztetettek. Ezért elengedhetetlenül fontos, hogy tisztában legyünk azokkal az idegrendszerben bekövetkező változásokkal, melyek az életkorhoz köthetők és az agy fokozott sérülékenységet eredményezik. Ez hosszútávon segíthet bennünket abban, hogy új, specifikusabb terápiákat tudjunk kidolgozni, illetve a betegségmodelleken keresztül a korral járó alapvető ideg- és keringésélettani változásokat is jobban megérthetjük

Rövidítések jegyzéke

aCSF	artificial cerebrospinal fluid, mesterséges cerebrospinális folyadék
ATP	adenozin-trifoszfát
CBF	cerebral blood flow, agyi vérátáramlás
IOS	intrinsic optical signal, belső (saját) optikai jel
NO	nitrogén-monoxid
PID	peri-infarct depolarization, periinfarktus depolarizáció
SD	spreading depolarization, kúszó (kérgi) depolarizációs jelenség
tMCAO	transient arteria cerebri media okklúzió
VS	voltage-sensitive, feszültségfüggő

Irodalomjegyzék

1. Chen RL, Balami JS, Esiri MM, Chen LK, Buchan, AM., Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nat Rev Neurol*. 2010 May;6(5):256-65. doi: 10.1038/nrneurol.2010.36. Epub 2010 Apr 6.
2. World Health Organisation (1978). *Cerebrovascular Disorders (Offset Publications)*. Geneva: World Health Organization. ISBN 92-4-170043-2. OCLC 4757533
3. Fonarow GC, Reeves MJ, Zhao X, Olson DM, Smith EE, Saver JL, Schwamm LH; Get With the Guidelines-Stroke Steering Committee and Investigators. Age-related differences in characteristics, performance measures, treatment trends, and outcomes in patients with ischemic stroke. *Circulation*. 2010 Feb 23;121(7):879-91. doi: 0.1161/CIRCULATIONAHA.109.892497. Epub 2010 Feb 8.
4. Petcu EB, Sfredel V, Platt D, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review. *Gerontology*. 2008;54(1):6-17. Epub 2007 Dec 21.
5. Ay H, Koroshetz WJ, Vangel M, Benner T, Melnosky C, Zhu M, Menezes N, Lopez CJ, Sorensen AG. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke*. 2005 Dec;36(12):2632-6. Epub 2005 Nov 3.
6. Knoflach M, Matosevic B, Rücker M, Furtner M, Mair A, Wille G, Zangerle A, Werner P, Ferrari J, Schmidauer C, Seyfang L, Kiechl S, Willeit J; Austrian Stroke Unit Registry Collaborators. *Neurology*. 2012 Jan 24;78(4):279-85. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824367ab. Epub 2012 Jan 11. Functional recovery after ischemic stroke--a matter of age: data from the Austrian Stroke Unit Registry.
7. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Oct;65(10):1028-41. doi: 10.1093/gerona/g1q113.
8. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, R.N. Mitchell, 2007. *Robbins Basic Pathology*. 8th Edition. ISBN 978-0-8089-2366-4
9. Fonyó A., Ligeti E., 2008. *Az orvosi élettan tankönyve*. Negyedik, átdolgozott és

bővített kiadás. ISBN 978 963 226 126 3

10. Katsura K, Kristián T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans.* 1994 Nov;22(4):991-6. Review
11. Lauritzen M., Dreier J.P., Fabricius M., Hartings J.A., Graf R., Strong A.J.: Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31, 17-35; 2011.
12. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell.* 1997 Dec 26;91(7):917-25.
13. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997 Mar;20(3):132-9.
14. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391-7.
15. Hou ST, MacManus JP. Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int Rev Cytol.* 2002;221:93-148.
16. Leao A.P.: Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J Neurophysiol* 7:359-390; 1944.
17. Lauritzen M., Olesen J.: Regional cerebral blood flow during migraine attacks by Xenon-133 inhalation and emission tomography, *Brain*, 107, 447-461, 1984.
18. Nedergaard M., Hansen A.J.: Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain; *Brain Research*; 449; 395-398; 1988.
19. Martins-Ferreira H., Nedergaard M., Nicholson C.: Perspectives on spreading depression, *Brain Research Reviews* 32; 215-234; 2000.
20. Somjen G.G.: Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization, *Physiol Rev.*, 81, 1065-1096, 2001.
21. Farkas E., Obrenovitch T.P., Institoris Á., Bari F.: Effects of early aging and

- cerebral hypoperfusion on spreading depression in rats, *Neurobiol. Aging*, 2011. Szept., 32(9); 1707-15. Epub: 2009.
22. Farkas E., Bari F., Obrenovitch T.P.: Multi-modal imaging of anoxic depolarization and hemodynamic changes induced by cardiac arrest in the rat cerebral cortex, *Neuroimage*, 51 (2), 734-742; 2010.
 23. Dreier J.P.: The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease, *Nature Medicine* 17, 439-447; 2011.
 24. Joshi I., Andrew R.D.: Imaging anoxic depolarization during ischemia – like conditions in the mouse hemi-brain slice; *Journal of Neurophysiology* 85, 414-424; 2001.
 25. Shin H.K., Dunn A.K., Jones P.B., Boas D.A., Moskowitz M.A., Ayata C.: Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26, 1018-1030; 2006.
 26. Farkas E., Bari F.: Az agytraumával vagy stroke-kal járó agykérgi kúszó depolarizáció és periinfarctus depolarizáció patofiziológiai jelentősége, *Vascularis Neurologia*, II. évf/3. Szám, 2010.
 27. Dreier J.P., Major S., Manning A., Woitzig J., Drendzhahn C., Steinebrink J., Toliaş C., Oliveira-Ferreira A. I., Fabricius M., Hartings J.A., Lajkóczy P., Lauritzen M., Dirnagl U., Bohner G., Strong A.J.: Cortical spreading ischemia is a novel process involved in ischemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage, *Brain*, 132, 1866-1881, 2009.
 28. Dreier J.P. , Körner K. ,Ebert N. ,Görner A. , Rubin I., Back T., Lindauer U. , Wolf T. , Villringer T., Einhüpl A. , Lauritzen M., Dirnagl U.: Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 9: 978-990; 1998.
 29. Nakamura H., Strong A.J., Dohmen C., Sakowitz O.W., Vollmar S., Sué M,

- Kracht L., Hashemi P., Bhatia L., Yoshimine T., Dreier J.P., Dunn A.K., Graf R.: Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions, 133, 1994-2006; 2010.
30. Grinvald A, Hildesheim R. VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Nov;5(11):874-85.
 31. Farkas E., Pratt E., Sengpiel F., Obrenovitch T.P.: Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarization using a fluorescent, voltage-sensitive dye, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28, 251-262; 2008.
 32. Obrenovitch TP, Chen S, Farkas E. Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods. *Neuroimage.* 2009 Mar 1;45(1):68-74. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.11.025. Epub 2008 Dec 6.
 33. Brand S, Fernandes de Lima VM, Hanke W. Pharmacological modulation of the refractory period of retinal spreading depression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998 Apr;357(4):419-25.
 34. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain.* 2006 Mar;129(Pt 3):778-90. Epub 2005 Dec 19.
 35. Knox CA. Effects of aging and chronic arterial hypertension on the cell populations in the neocortex and archicortex of the rat. *Acta Neuropathol.* 1982;56(2):139-45.
 36. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke.* 2002 Dec;33(12):2738-43.
 37. González de la Aleja J, Ramos A, Mato-Abad V, Martínez-Salio A, Hernández-Tamames JA, Molina JA, Hernández-Gallego J, Alvarez-Linera J. Higher glutamate to glutamine ratios in occipital regions in women with migraine

during the interictal state. Headache. 2013 Feb;53(2):365-75. doi: 10.1111/head.12030. Epub 2012 Dec 20.

Kathy R. Magnusson, Brenna L. Brim and Siba R. Das Selective vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors during brain aging. Frontiers in aging science. 2010

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Bari Ferenc professzor úrnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a Cerebrovaszkuláris Laboratóriumban tudományos diákköri munkát végezhsek és bármikor, bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzá. Szeretnék továbbá köszönetet mondani Darren L. Clarknak, az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet tudományos munkatársának, aki nélkül ez a szakdolgozat nem jöhetett volna létre, hiszen ő tervezte és hajtotta végre a műtétsorozatot. Végül pedig szeretnék köszönetet mondani Institoris Ádámnak, az Élettani Intézet egyetemi tanársegédjének, aki a munka során második témavezetőmmé vált, és hasznos tanácsaival nagyon sokat segített nekem, hogy képes legyek kidolgozni az eltervezett algoritmusokat.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

NYILATKOZAT

Alulírott Kozák Gábor, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának hallgatója ezennel büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy „Patkányagy vizsgálata hypoxiás körülmények között multimodális képalkotó eljárással” című szakdolgozatom **saját, önálló munkám**; az abban hivatkozott nyomtatott és elektronikus szakirodalom felhasználása a szerzői jogok nemzetközi szabályainak megfelelően készült.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozat esetén plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem, és tudomásul veszem, hogy plágium esetén szakdolgozatom visszautasításra kerül.

Szeged, 2014. év január hó 24. nap

.....
aláírás