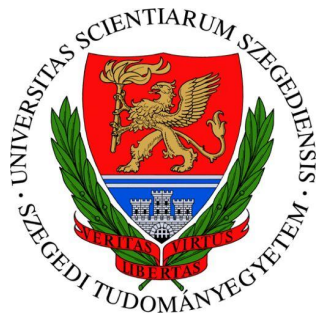


AGYKÉRGI KÚSZÓ DEPOLARIZÁCIÓKHOZ CSATOLT ÁRAMLÁSI TRANZIENSEK PREDIKTÍV ÉRTÉKE FOKÁLIS AGYI ISCHÉMIÁBAN

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Lückl János



Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Témavezető: Prof. Bari Ferenc, PhD, D.Sc

Szeged

2013

1. BEVEZETÉS

1.1. Az agykérgi kúszó depolarizáció jelensége

A kúszó depolarizáció jelenségét először Aristides Leao írta le (Leao, 1944). A szerző a kísérletesen kiváltott epilepszia terjedését kívánta vizsgálni, amikor az elektro-kortikogrammon (ECoG) az agyi elektromos aktivitás átmeneti megszűnését észlelte. Később az ECoG változásokkal szinkron, negatív potenciálváltozást (-5 to -15 mV) vezetett el az agyfelszínről, amelyet agykérgi kúszó depolarizációnak (cortical spreading depression, CSD) nevezett el. Először Collewijn és Van Harreveld mérte meg az idegsejten belüli potenciál változásokat CSD során, és azt tapasztalták, hogy a membrán potenciál sosem éri el a nulla értéket (Collewijn and Harreveld, 1966). Az idegsejtek eme közel teljes depolarizációját (Somjen and Aitken, 1984, Czeh et al., 1993) a membrán ellenállás csökkenése (Czeh et al., 1993), az agyi elektromos aktivitás átmeneti megszűnése (Leao, 1944) (Czeh et al., 1993), az idegsejtek megduzzadása (Takano et al., 2007) valamint citotoxikus ödéma (Kraig and Nicholson 1978; Takano et al 2007) kíséri. Sem idegsejtek tüzelése, sem szinaptikus jelátvitel nem feltétele a CSD-k keletkezésének (Kow and van Harreveld, 1972, Mori et al., 1976, Muller and Somjen, 2000). Ugyanakkor, mind az extracelluláris kálium mind a glutamát részt vesz a CSD-k kialakulásában és terjedésében.

1.2 A kúszó depolarizációk szerepe az agyi károsodásban

A CSD Janus arcú jelenség. Egyrészt neuroprotektív hatással bír a plaszticitás és a regeneráció elősegítésére (Matsushima et al., 1996, Yanamoto et al., 2005) révén, másrészt – állat és humán kísérletek alapján – bizonyítottan szerepet játszik olyan kórképek patofiziológiájában, mint a subarahnoidális vérzés, az iszkémiás stroke, vagy a zárt koponyasérülés (Lauritzen et al., 2011). A fokozott kalcium beáramlás (25 μ M-ig) az egyik lehetséges mechanizmus, amellyel a CSD idegsejt károsodást képes kiváltani (Dietz et al 2008). Ezzel egyidejűleg az ionháztartás felborulása a glutamát transzporter fordított irányú működéséhez vezet, amely ennek következtében növeli a glutamát kiáramlását a sejtekből (Rossi et al 2000). Ugyanakkor, az N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonisták gátolni képesek a CSD hullámokat és az infarktus növekedését (Iijima et al., 1992, Hossmann, 1994, Hertle et al., 2012). A normál szövet akár több CSD-t is képes tolerálni (Nedergaard and

Hansen, 1988), de az agyszövetet érő, CSD-vel járó metabolikus stressz jelentősen fokozódik pl., ha a vérátáramlás jelentősen lecsökken (Hossmann, 1994). Kísérletes iszkémiában a CSD-k (az első depolarizáció kivételével) a penumbra és a mag (core) határáról indulnak ki és gyakran az iszkémiás mag körül keringenek (Nakamura et al., 2010). Keletkezésük topográfiája szerint ezeket a depolarizációkat peri-infarktusz depolarizációként (PID) említik (Hossmann, 1996). A depolarizációs hullámok száma ill. időtartama összefüggést mutat az infarktus kiterjedésével (Mies et al., 1993, Dijkhuizen et al., 1999).

1.3 Az agykérgi kúszó depolarizációkat kísérő hemodinamikai válasz

Leao, a depolarizációhoz kapcsolatosan a piális artériák átmeneti dilatációját figyelte meg az egyik korai kísérletében (Leao et al., 1944). A CSD-hez kapcsolt áramlás növekedés meghaladja a 100%-ot (Lauritzen, 1994), valamint a hemodinamikai válasz több hasonlóságot mutat a neurovaszkuláris egység működésével. A fő dilatátor anyagok a calcitonin gén-rokon peptid (Colonna et al., 1994, Reuter et al., 1998, Bari and Paprika, 2000), a perivaszkuláris idegekből származó acetilkolin, (Reuter et al., 1998) valamint a nitrogén monoxid (Colonna et al., 1997). Ezen túlmenően a prosztaglandinok csökkentik az érösszehúzóds mértékét a parenchimális és piális erekben (Shibata et al., 1992). A patológiás környezet viszont megváltoztathatja a CSD-re adott hemodinamikai választ (Bari et al., 1998, Sukhotinsky et al., 2008, Sonn and Mayevsky, 2012). Például a subarachnoidális vérzés egy patkánymodelljében a CSD-hez kapcsolt, kifejezett, artériás érösszehúzóds és hipoperfúziót írtak le (Dreier et al., 1998). Iijima és munkatársai (1992) viszont lézer Doppleres áramlásmérést (laser Doppler flowmetry, LDF) alkalmazva azt találták, hogy a PID-hez kötött peri-infarct áramlási tranziensek (PIT) hiperémiát mutatnak fokális agyi iszkémiában (Iijima et al., 1992). Hasonlóképp, saját korábbi munkáink során azt tapasztaltuk, hogy agyi iszkémiában az LD-rel gyűjtött áramlási tranziensek 70-90%-a hiperémiás és nem mutatnak térbeli heterogenitást. Ugyanakkor, iszkémia során lézer folt interferencia analízisen alapuló képalkotással (laser speckle contrast analysis, LASCA) detektált PIT-ek polimorfnak bizonyultak az egér agyban (Shin et al., 2006).

1.4 Az agykérgi kúszó depolarizáció, mint lehetséges biomarker a kísérletes és klinikai kutatásban

Kitartó, több évtizedes kutatások ellenére a rekombináns szöveti plazminogén aktivátorral végzett thrombolízis az egyetlen elfogadott terápia az ischémiás stroke kezelésében az Amerikai Egyesült Államokban és Európában. A kísérletes és klinikai kutatások közötti

transzlációs blokkok áthidalására ez egyik lehetőség a biomarkerek alkalmazása. A biomarkerek többféle módon is alkalmazhatók: például a diagnózis felállításakor, a prognózis megítélésére, a megfelelő beteganyag kiválasztására, valamint felvilágosítást adhat a betegség pathomechanizmusát és progresszióját illetően. Állatkísérletes adatok alapján a CSD-k fontos szerepet játszanak az iszkémiás agyi károsodás progressziójában (Hossmann, 1996, Dijkhuizen et al., 1999, Shin et al., 2006, Nakamura et al., 2010), és így biomarkerként szolgálhatnak minden CSD-hez kapcsolható kórképekben. A CSD-k klinikai, elektrofiziológiai észlelése már most is zajlik invazív módon olyan betegeknél, akiknek az állapota megköveteli a koponya megnyitását (pl. subarachnoidális vérzés, malignus cerebri media infarktus, és súlyos koponyasérülés) (Hartings et al., 2011) (Drenckhahn et al., 2012). Ugyanakkor, a CSD-k non-invazív (koponyán keresztüli) követése lehetővé tenné a klinikusok számára nagyobb méretű betegpopuláció (pl. összes iszkémiás stroke vagy enyhe fejsérülés) vizsgálatát, ráadásul késedelem nélkül, közvetlenül a kiváltó esemény után. A CSD-k koponyán keresztüli detektálásának nehézségei miatt fordul egyre inkább a figyelem az alternatív biomarkerek, mint pl. a PIT-ek irányába, amelyek tulajdonképpen a CSD-k hemodinamikai kísérő jelenségei. Az betegágy melletti, non-invazív áramlásmérésre a közeli infravörös (near infrared spectroscopy) és a diffúz korrelációs (diffuse correlation) spektroszkópia már jelenleg is rendelkezésre áll (Obrig and Villringer, 2003, Durduran et al., 2010).

1.5 Célkitűzések

Állatkísérletes modellekben teszteltük, hogy a PIT-ek alkalmazhatók-e biomarkerként a stroke transzlációs kutatásban. Két hasonló lézertoptikai módszert, a LDF-t és a LASCA-t alkalmaztunk a hemodinamikai változások mérésére fokális agyi ischémiában. A LDF a Doppler-effektuson alapuló áramlásmérő módszer, amelynek lényege, hogy a lézernyaláb frekvencia eltolódásából méri a részecskék sebességét. Segítségével a véráramlás változása mérhető egy tetszőleges ponton. Ezzel szemben, a LASCA egy nagy felbontású, kétdimenziós áramlásmérő módszer. Alapelve azon a megfigyelésen alapul, hogy a szórt lézer fény egy random interferencia mintát produkál, amelynek fluktuációjából az alatta lévő médiumban mozgó részecskék sebességére lehet következtetni. (Briers, 2001). A PIT-ek következő paramétereit mértük: frekvencia, amplitúdó és morfológia. A hipotéziseink a következők:

I. Feltételeztük, hogy a PIT-ek es a CSD-k („golden standard”) között nagyfokú kapcsoltság áll fenn. Mivel az irodalomban az erre vonatkozó adatok hiányoztak, filament okklúziós

modellben állapítottuk meg a kapcsoltság fokát a DC potenciálváltozások és az áramlási tranziensek között.

II. Feltételeztük, hogy a PIT-ek paraméterei (frekvencia, amplitúdó) önmagukban vagy egyéb áramlási paraméterrel (a véráramlás mértéke iszkémia során, a reperfúzió mértéke) kombinálva képesek előjelezni az infarktus méretét, kiterjedését. Ezért, korábbi filament okkluzios (n=55) kísérletek „post hoc” analízisét végeztük el.

III. Feltételeztük, hogy a PIT-ek amplitúdója és morfológiája térbeli heterogenitást mutat, és ezáltal alkalmasak az iszkémiás mag, a penumbra és a peri-iszkémiás régiók elkülönítésében. Az áramlási tranziensek amplitúdójának nagyságát, ill. a morfológiájuk térbeli eloszlását filament okklúzióban és az arteria cerebri media (MCA) fotokémiai okklúziójának modelljében vizsgáltuk.

2. MÓDSZEREK

2.1 Hipotézis I

Hím, felnőtt Sprague-Dawley patkányokat (290-340g) (n=32) altattunk 1.2 % izoflurán, valamint 70% N₂O és 30% O₂ gázkeverékében. A fiziológiai paramétereket (vérnyomás, testhőmérséklet, vérgázok) a kísérlet során végig ellenőriztük. Hanyatt fekvő helyzetben végeztük az állatokon a filament okklúziót (Luckl et al., 2009). Röviden, a jobb oldali arteria carotis communis-t (CCA) izoláltuk a környező kötőszövettől, majd selyem fonállal elkötöttük. A 0.39 mm átmérőjű, szilikonnal borított nejlon fonalat (Doccol Corporation, Redlands, CA, USA) vezettünk be a CCA-n keresztül az arteria carotis interna-ba. Ezután a fonalat addig toltuk előre az MCA szájadék irányába, amíg az LDF egy markáns áramláscsökkenést jelzett. Kilencven perc után reperfúziót idéztünk elő a fonal visszahúzásával, majd további tíz percen át monitoroztuk a véráramlást. Egy laser Doppler (LD) optód-ot (optódhegy átmérő 1mm, optikai száltávolság 0.25 mm) (PeriFlux 4001; Perimed, Stockholm, Svédország) ragasztottunk kb. 1 mm átmérőjű, körkörös elvékonyított koponyacsont fölé (a középvonaltól 4-5 mm laterálisan, a Bregma-tól 1-2 mm posterior irányban). ECoG-t and DC potenciált regisztráltunk epidurális ezüst klorid elektródokkal (középvonaltól 4-5 mm laterálisan, a Bregma-tól 4-5 mm posterior irányban) a jobb félteke MCA ellátási területe felett. Az elektródákat differenciál erősítőhöz kapcsoltuk (Jens Meyer, München, Németország) ill. analóg-digitális átalakítást végeztünk (Power 1401, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Anglia). A DC potenciálváltozásokat 200× erősítéssel, az EEG aktivitást 5000× erősítéssel gyűjtöttük.

A depolarizációkat, mint nagy (-5 to -15 mV), terjedő, negatív DC potenciálváltozás azonosítottuk. A kapcsoltág mértékét a PIT és a DC potenciálváltozások arányaként határoztuk meg.

2.2 Hipotézis II

Hím, felnőtt Sprague-Dawley patkányok (n=55), 90 perces filament okklúzió-t követően 72 órát éltek túl. Az állatok egy csoportja (n=32) 1.2% izoflurán, míg a másik csoportja (n=23) 1.2% halotán anesztéziában részesült.

Az általános sebészeti beavatkozásokat és a filament okklúziót hasonlóan végeztük, ahogy azt korábban a 2.1 fejezetben részleteztük.

Az ischémia (90 perc) és a reperfúzió során (10 perc) mért átlagos véráramlást a kiindulási érték százalékában fejeztük ki. A PIT-ek felismerésének elveit már korábban kidolgoztuk: (Luckl et al 2008; Luckl et al 2009): (a) az áramlási tranziensek amplitudója nagyobb, mint 5 %, az okklúzió előtti kiindulási értékhez viszonyítva; (b) a PIT-ek időtartama hosszabb, mint 60 perc; (c) stabil vérnyomás a tranziensek terjedése során.

72 óra túlélés után az infarktus nagyságát 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) festéssel állapítottuk meg (Lückl 2008). Röviden, az agyakat először jeges, fiziológiás só oldatban hűtöttük, majd a koronális síkban, egy mátrix segítségével 2 mm-es szeleteket vágunk. Az agyszeleteket 2 %-os TTC-t tartalmazó foszfát-pufferelt fiziológiás só oldatban inkubáltuk 10 percig. A megfestett agyszeleteket digitalizáltuk, majd egy képelemző szoftver segítségével analizáltuk. (AIS 6.0; Imaging Research Inc., St. Catharines, ON, Kanada).

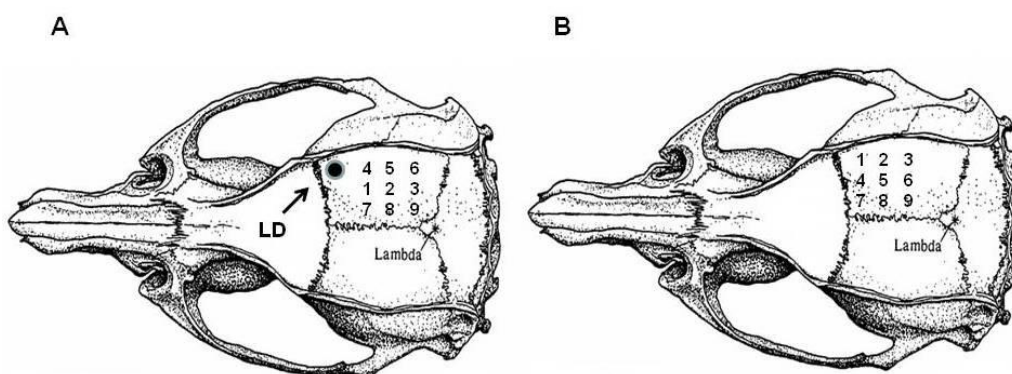
2.3. Hipotézis III/a

Az általános sebészeti beavatkozást (n=10) és a filament okklúziót hasonlóan végeztük, ahogy azt a 2.1 fejezetben részleteztük. Az okklúziót hason fekvő helyzetben, egy sztereotaxiás keretben végeztük. A koponyacsontot egy 5x5 mm-es nagyságú területen (a négyzet alapú terület középpontja a Bregma-tól 5 mm posterior és 4 mm laterális irányban található) vékonyítottuk el fogászati fűrő segítségével. A LD optódot a Bregma-tól 5 mm-re laterálisan ragasztottuk fel.

Az elvékonyított koponyacsontot lézer diódával világítottuk meg egyenletesen (Hitachi, HL 785 1G, 785nm, 50mW, Thorlabs, Newton, NJ, USA). Egy százalékos hidrox-cellulóz géllal, tetején egy vékony, szövettani fedőlemezzel borítottuk a csontfelületet, csökkentve az

általán indukált fényvisszaverődést. A képalkotáshoz 12-Bites, TEC hűtött CCD kamerát (Uniq, Uniq Vision INC, USA) és képanalizáló szoftvert (StreamPix, NorPix, Montreal, Quebec, Kanada) használtunk. A kamera másodpercenként tíz felvételt készített az okklúzió teljes ideje alatt. Egy 7 x 7 „mozgó ablakot” használtunk a speckle kontraszt képek ill. az áramlási térképek kiszámolására (Briers, 2001) (Dunn et al., 2001, Durduran et al., 2004). Tíz áramlási képet átlagoltunk tovább javítva a jel-zaj viszonyt. A relatív véráramlási térképeket normalizáltuk és korrigáltuk a biológiai zéró (szívmegállást követően mért áramlási értékek átlaga) értékével. (Strong et al., 2006, Zhou et al., 2008). Kilenc, releváns vizsgálati területet (region of interest, ROI) (**1. ábra**) helyeztünk el az áramlási képeken egyenletesen, ügyelve arra, hogy látható nagy erek ne kerüljenek alájuk.

A PIT-eket a terjedésük alapján azonosítottuk: egy áramlás tranziens legalább két ROI felett, megfelelő időkülönbséggel észlelve. Meghatároztuk a különböző morfológiájú PIT-ek százalékos arányát minden egyes ROI felett. A csúcstól-csúcsig mért amplitúdó nagyságát az okklúzió előtt mért véráramlás százalékában határoztuk meg. Az amplitúdók hipoperfúziós és hiperémiás komponenseit külön mértük.



1. ábra. Vázlatos elhelyezkedése a kilenc releváns tartománynak (ROI 1-9), valamint a lézer Doppler optód pozíciójának a filament okklúzió (A) és a fotokémiai úton indukált artéria cerebri média okklúzió (B) modelljében.

2.4. Hipotézis III/b

Hím, felnőtt Sprague-Dawley patkányokat (290-340g) (n=32) altattunk 1.2 % izoflurán, valamint 70% N₂O és 30% O₂ gázkeverékében. A jobb oldali CCA-t izoláltuk a környező kötőszövetől, és egy hurkot helyeztünk az ér köré. Az állatot sztereotaxiás keretbe helyeztük, majd a koponyacsontot egy 6x6 mm-es területen (a négyzet alapú terület középpontja a Bregma-tól 3 mm posterior és 4 mm laterális irányban található) vékonyítottuk el fogászati fúró segítségével. A musculus temporalist elkülönítettük, majd fúró segítségével operációs

mikroszkóp (Carl Zeiss, Inc.) alatt egy kb. 4 mm nagyságú furatot készítettünk 1 mm-rel az arcus zygomaticus és pars squamosa kapcsolódása előtt, feltárva az MCA disztális szakaszát. Az okklúziót Erythrosin B (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 40 mg/kg dózisú intravénás adásával indukáltuk. Közvetlenül a festék befecskendezése után egy lézernyalábot (532 nm, 4mW, LaserGlow Technologies, model LRS-0532-KFM-00030-03) irányítottunk 5 percen keresztül az MCA-ra. A thrombus az artéria Y elágazásától proximálisan keletkezett az irradiáció helyének megfelelően.

Bár nemcsak a véráramlást monitoroztuk LASCA-val, hanem a szöveti hemoglobin /oxigénszaturáció változásait is nyomon követtük fényvisszaverődésen alapuló (intrinsic optical signal, IOS) optikai képalkotással (Luckl et al., 2010), a jelen analízisben csak az áramlási adatokat dolgoztuk fel. A kísérletekben ugyanazokat a műszereket (kamera, lencse, software-t stb) használtuk, mint az előző kísérletsorozat során (2.3).

Az iszkémia monitorozása 120 percen át történt. Két másodpercenként három darab IOS és tizenöt darab LASCA felvétel készült. A nagy térbeli felbontású áramlási térképeket kilenc szektorra osztottuk, amelyekben kilenc releváns vizsgálati területet (ROI, 0.3 mm) (1. **ábra**) jelöltünk ki, ügyelve arra, hogy látható nagy erek ne kerüljenek alájuk. Az áramlási tranziensek paramétereit hasonlóan mértük és elemeztük, mint ahogy azt már korábban a 2.3 fejezetben részleteztük.

24 óra túlélés után az infarktus nagyságát 1.5 mm vastagságú agyszeleteken, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) festéssel állapítottuk meg.

2.5 Statisztikai elemzések

A fiziológia paraméterek változásait (kiindulási ill. iszkémia során mért érték) páros t-próbával vizsgáltuk minden egyes kísérletsorozatban.

A filament okklúziós állatokban az egyes anesztézia csoportok között esetlegesen fennálló különbségeket az áramlási paraméterekben és a szövettani kimenetelben kétmintás t-próbával vizsgáltuk. Szóródási görbe alapján csoportosítottuk az állatokat annak megfelelően, hogy az adott állatban jelentős vagy csekély nagyságú kortikális infarktus fejlődött ki. Binomiális logisztikus regressziót végeztünk az egyes biomarkerek analíziséhez R Software felhasználásával. Az önálló biomarkerek esetében, ez egy diszkriminációs pont meghatározását jelzi, amely elkülöníti az állatokat a jelentős (infarktus > 80mm²) ill. csekély kortikális infarktus megléte alapján. A helyesen megbecsült állatok (correctly predicted

animals, CPA) számát, amely segít a különböző biomarkerek rangsorolásában, a diszkriminációs pont alapján számoltuk ki. A modell alkalmazásával meghatározhatók azok a „határok”, amelyen túl az állatok 95%-os bizonyossággal sorolhatók az egyik vagy a másik csoportba. Az előbb részletezett analízis alkalmas biomarkerek kettős kombinációjának elemzésére is, azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben egy diszkriminációs vonalat határozunk meg. Annak eldöntésére, hogy egy további paraméter kombinálása előnyt jelent-e (kettős kombináció versus hármas kombináció), a valószínűségi arány tesztet végeztük el.

Ezen felül, az összegyűjtött adatokat egy mátrixba helyeztük el, hogy további összefüggéseket találjunk a szövettani kimenetel és a különböző áramlási paraméterek között. Ebből a célból Spearman korrelációs analízist végeztünk külön mind a halotán, mind az izoflurán és a kombinált (izoflurán+halotán) csoporton. A regressziós analízist nem korrigáltuk többszörös teszttel.

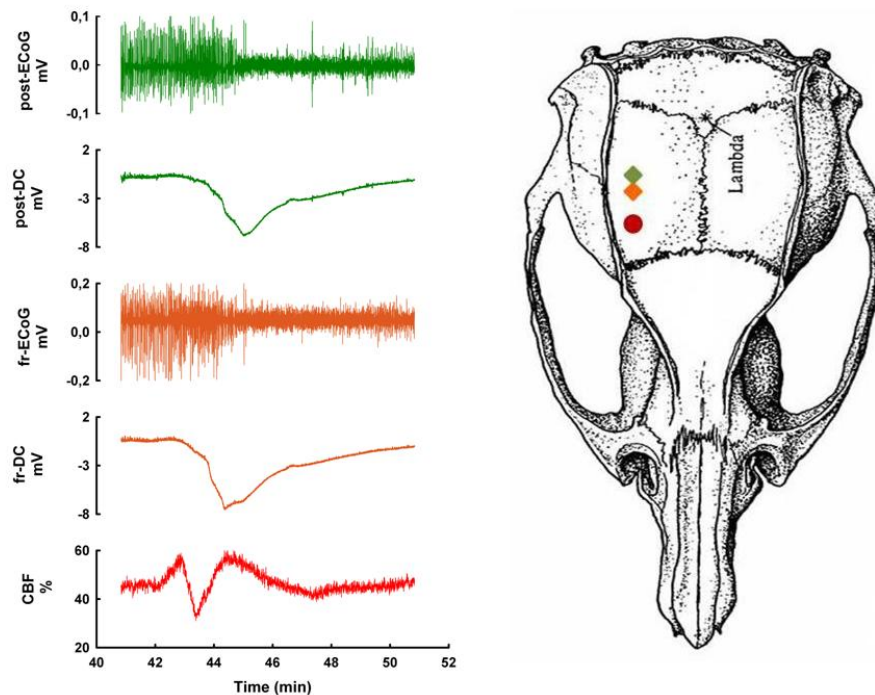
Kétutas variancia analízist (ANOVA) végeztünk minden egyes LASCA kísérletsorozatban (hipotézis III/a és III/b), hogy teszteljük, a PIT-ek morfológiája ill. hogy a véráramlás ischémia során mutat-e regionális heterogenitást. Szintén mindegyik LASCA kísérletsorozatban vizsgáltuk a kétmintás t-próba segítségével, hogy az amplitúdók nagysága (csúcstól-csúcsig, hiperémia ill. hipoperfúzió komponens) mutat-e különbséget a penumbra és a peri-ischemiás területek között. Statisztikailag szignifikánsnak a 0.05-nél kisebb p-értékeket fogadtuk el.

3. EREDMÉNYEK

Az élettani paraméterek a normál tartományban voltak minden egyes állatban, mind a sebészi előkészítés mind az ischémias állapot alatt.

3.1. Hipotézis I.

46 CSD-t, és hozzá kapcsolatosan 41 PIT-et regisztráltunk (a kapcsoltság aránya 89%) filament okklúzió során (n=12) (**2. ábra**). A kapcsoltság aránya csak 76% volt azon állatokban, ahol az iszkémia során mért áramlás kisebb volt, mint a kiindulási érték 20%-a. Még további húsz állattal kibővítve az eredeti kísérletsorozatot (n=32), arra a felismerésre jutottunk, hogy a CSD-PIT kapcsoltság foka 93%.



2. ábra Epidurális DC, ECoG és véráramlás (cerebral blood flow, CBF) mérés filament okklúzió során. A két ezüst-klorid elektróda (négyzettel jelölve) (frontális (fr) and posterior (occ)) 2 ill. 3 mm-rel a lézer Doppler optód (körrel jelölve) mögött let elhelyezve.

3.2. Hipotézis II

A szövettani vizsgálat az agyi infarktusok bimodális eloszlását mutatta. Harminckilenc állatban (71%) alakult ki károsodás mind a basalis ggl.-ok területén, mind az agykéregben (átlagosan $130\text{-}140\text{ mm}^3$, de sosem kevesebb, mint 89 mm^3). A többi állatban ($n=16$) a basalis ggl. mindig érintve volt, de a kéregben egyáltalán nem, vagy csak csekély mértékű infarktus alakult ki.

A regressziós analízis (**1. táblázat**) azt mutatta, hogy ha egyenként vizsgáljuk a biomarkereket, akkor a PIT-ek száma a legpontosabb marker minden egyes anesztézia csoportban. Például a kombinált anesztézia csoportban ($n=55$) negyvenöt állat esetében lehetett a kimenetelt megjósolni a diszkriminációs pont (3.8) segítségével. Fontos megjegyezni, hogy ha a diszkriminációs pontot képletesen az értéktartományon kívül helyeznénk el, a „legrosszabb eset”-ben akkor is lenne 39 megfelelően megjósolt állatunk. Mivel a helyesen megjósolt állatok száma a legtöbb biomarker (amplitúdó, ischémia során

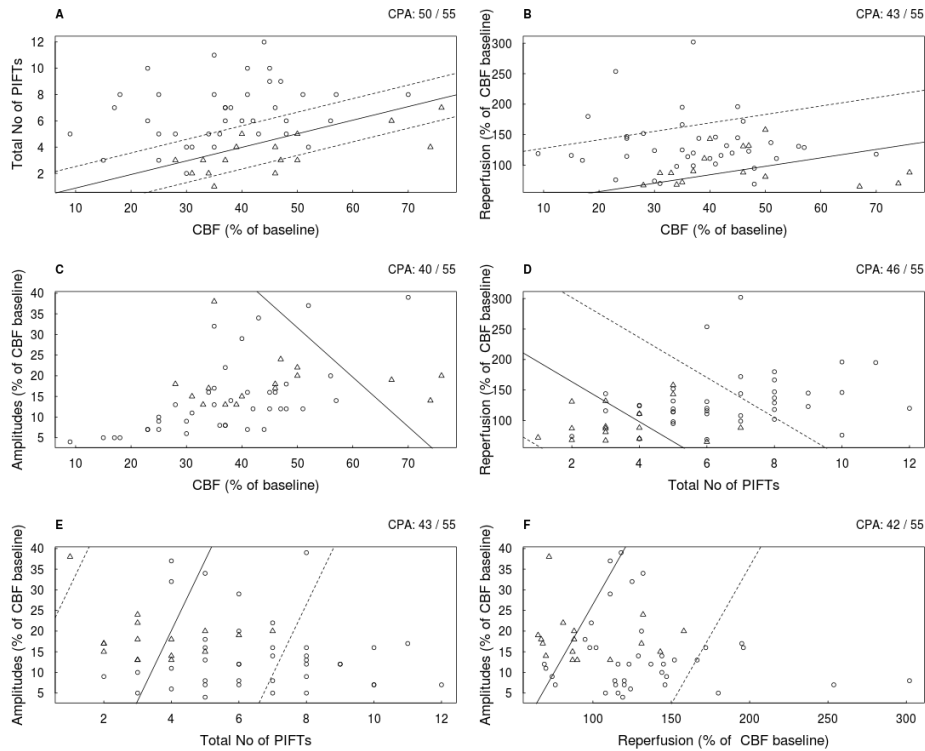
mért véráramlás, reperfúzió stb) esetében közel van a „legrosszabb eset“-hez, ezért ezek a markerek valójában nem alkalmasak a szövettani kimenetel megbecslésére.

1. táblázat Az egyes biomarkerek logisztikai regressziós analízise különböző anesztézia csoportokban.

Anesztézia	Áramlási paraméterek	Érték tartomány	Diszkriminációs pont	Alsó határ	Felső határ	CPA
<i>ISO</i> (n=32)	CBF %	9-74	62	12	112	26
	PIT-ek száma	1-12	2.8	-1.2	6.8	27
	Reperfúzió %	65-302	75	6	144	26
	Amplitúdó %	4-39	41	-15	98	25
<i>HALO</i> (n=23)	CBF %	17-76	56	-36	149	14
	PIT-ek száma	2-10	5.1	2.6	7.6	20
	Reperfúzió %	67-196	103	21	186	17
	Amplitúdó %	5-37	20	-9	49	15
<i>ISO+HALO</i> (n=55)	CBF %	9-76	59	0	118	41
	PIT-ek száma	1-12	3.8	0.2	7.4	45
	Reperfúzió %	65-302	85	-1	171	41
	Amplitúdó %	4-39	31	-18	80	36

Az ischémia során mért véráramlás (cerebral blood flow, CBF), az amplitúdó, és a reperfúzió a kiindulási (okklúzió előtti) érték százalékában van meghatározva. CPA= correctly predicted animals (helyesen megjósolt állatok száma).

A biomarker-kombinációk elemzése során azt találtuk, hogy az ischémia során mért véráramlás és a PIT-ek száma együttesen a legjobb prediktor a szövettani kimenetelt illetően mindegyik anesztézia csoportban (CPA_{ISO}:31/32, CPA_{HALO}:20/23, CPA_{ISO+HALO}: 50/55) (**3. ábra**). A valószínűségi arány teszt alapján, egy esetleges harmadik biomarker hozzáadása a legjobb kettős kombinációhoz már nem növeli annak prediktív értékét (legjobb kettős kombináció + amplitúdó; D=2.158, p=0.14) (legjobb kettős kombináció+ reperfúzió; D=0.00062, p=0.98)).



3. ábra A logisztikai regressziós analízis eredménye az összes állatban kettős biomarker kombinációkat vizsgálva. A körök jelképezik a jelentős nagyságú infarktussal, míg a háromszögek a csekély nagyságú infarktussal rendelkező állatokat (A-F). Az egyenes vonalak különítik el a két állatcsoportot a statisztikai elemzésnek megfelelően. A szaggatott vonal jelzi a határokat, amelyen túl a statisztikai modell 95%-os eséllyel becsül. CPA= correctly predicted animals (helyesen megjósolt állatok száma).

A Spearman analízis során négy olyan szignifikáns összefüggést találtunk, amely mindegyik anesztézia csoportban közös volt. A PIT-ek száma pozitív korrelációt mutat a kortikális infarktus és az ödéma nagyságával, míg a PIT-ek amplitúdója negatív összefüggést mutat az infarktus nagyságával. Az ischémia során mért áramlás pozitívan korrelál az amplitúdók nagyságával. Fontos megjegyezni, hogy a Spearman analízist megfelelő körültekintéssel kell értékelni, mivel a szignifikancia szintet nem korrigáltuk.

3.3 Hipotézis III/a

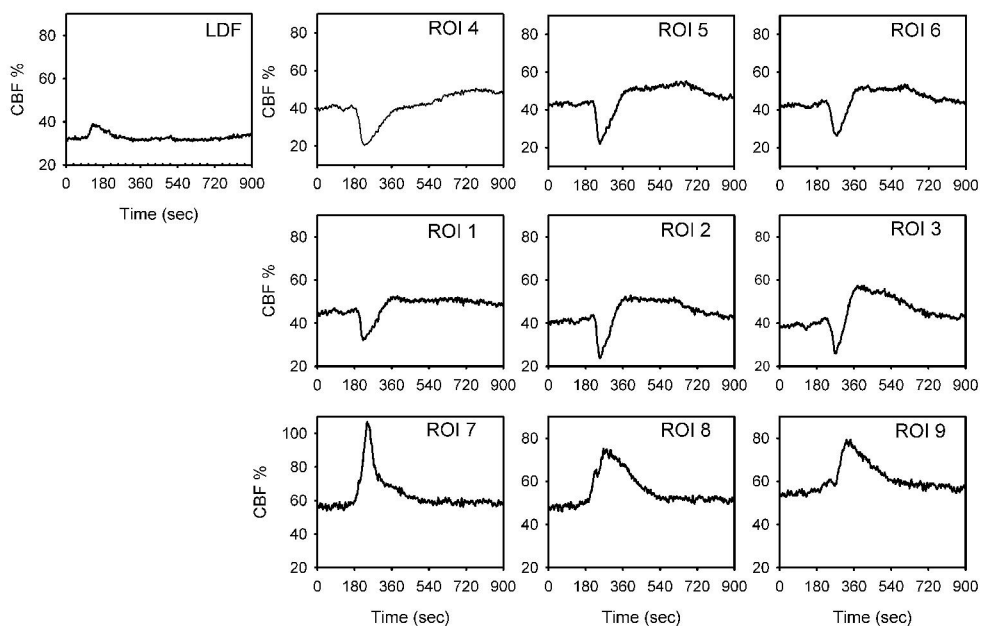
Az iszkémia során mért átlag véráramlás értékek 36-54% között alakultak a különböző ROI-k felett. Az átlagos véráramlás a mediális sorban (ROI 7-9: 47-54%) szignifikánsan magasabb ($p < 0.001$) volt, mint a középső (ROI 1-3: 38-39%), és laterális (ROI 4-6: 36-42%) sorokban. Anterior-posterior irányú heterogenitást nem észleltünk az áramlási értékekben. A szövettani szeleteket összehasonlítva az áramlási térképpel megállapítottuk, hogy a mediális sor (ROI 7-9) reprezentálja a peri-iszkémiás területeket, amely összhangban van az itt mérhető magasabb

áramlási értékekkel (arteria cerebri anterior-MCA határzóna). A PIT-ek átlagos száma állatonként $4.6 \pm 1.8/90$ min. 90 perc alatt 396 áramlási esemény volt látható a kilenc ROI felett a tíz állatban.

Öt különböző morfológiájú PIT-et különböztettünk meg (**4. ábra**): *I. monofázisos, hiperémiás; II.-III. bifázisos (hiperémia vagy hipoperfúzió domináns); IV.-V. monofázisos, hipoperfúziós (transziens vagy elnyújtott).*

I. típus A hiperémiás PIT-ek képviselik az összes esemény 45.7%-át (181/396). Az I. típus előfordulása a mediális sorban (peri-ischémiás terület, ROI 7-9) szignifikánsan gyakoribb, mint a laterálisabb sorokban (penumbra) ($p < 0.01$).

II-III. típus Az összes esemény 33.3%-a (132/396) bifázisos. A III. típus előfordulása szignifikánsan gyakoribb ($p < 0.01$) a penumbra felett.



4. ábra A peri-infarct transziensek morfológiájának térbeli heterogenitása. A panelek a különböző releváns vizsgálati területet (ROI 1-9) és a LD optód feletti relatív áramlásváltozásokat illusztrálják. Amíg a peri-ischémiás (ROI 7-9) területeket főleg a nagy amplitudójú hiperémiás transziensek jellemzik, addig a hipoperfúzió jellegű transziensek (III, IV, V) elsősorban a penumbra (ROI 1-6) felett jelennek meg.

IV-V. típus A hipoperfúzió áramlási transziensek az összes esemény 14.9%-át (59/396) teszik ki. A leggyakrabban (16-31%) az MCA antero-laterális (ROI 1,2,4,5) területén fordul elő. Az V. típusban a hipoperfúzió permanens, míg a IV. típusban rendszerint 2-3 percen belül az

áramlás visszatér a normál szintre. A IV/V. típus előfordulása szignifikánsan gyakoribb ($p < 0.01$) a laterális (penumbra) sorban, mint a mediálisban (ROI 7-9).

A csúcstól-csúcsig mért ($p < 0.01$) amplitúdó, ill. annak hiperémia komponense ($p = 0.01$) szignifikánsan magasabb volt a peri-iszkémiás vs penumbra területeken.

3.4 Hipotézis III/b.

Az iszkémia során mért átlag véráramlás értékek 34-64% között alakultak a különböző ROI-k felett. A PIT-ek elsősorban a mediális (ROI 7-9) és a középső (ROI 4-6) felett fordultak elő, míg összesen csak 3-4 áramlási eseményt észleltünk a laterális sor felett, amely feltehetőleg az iszkémiás magot reprezentálja. Az átlagos véráramlás a mediális sorban (ROI 7-9: 54-64%) szignifikánsan magasabb ($p < 0.001$) volt, mint a középső (penumbra) (ROI 4-6: 34-45%), és laterális (mag) (ROI 1-3: 35-39%) sorokban. A szövettani szeleteket összehasonlítva az áramlási térképpel megállapítható, hogy a mediális sor (ROI 7-9) képviseli a peri-iszkémiás területet.

Hasonlóan az előző kísérletsorozathoz (3.3), itt is összesen 5 különböző áramlási tranzienszt tudtunk megkülönböztetni. Összesen 201 áramlási eseményt detektáltunk a penumbra és a peri-iszkémiás terület felett (ROI 4-9). A II. ($p < 0.001$), a III. ($p < 0.01$) és a IV/V típus mutatott ($p < 0.05$) regionális heterogenitást, míg az I. típus nem I ($p = 0.06$). A III., és IV./V. típus a penumbra felett, míg a II. típus a peri-iszkémiás területek felett fordul elő gyakrabban. A csúcstól-csúcsig mért ($p < 0.001$) amplitúdó, ill. annak hiperémia komponense ($p < 0.001$) szignifikánsan magasabb volt a peri-iszkémiás vs penumbra területeken.

4. MEGBESZÉLÉS

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, a PIT-ek paraméterei (szám, amplitúdó, morfológia) alkalmazhatóak-e biomarkerként a stroke kutatásban. Az eredményeink azt mutatják, hogy a PIT-ek és a DC potenciálváltozások közötti kapcsoltság megfelelően nagyfokú, valamint a PIT-ek száma az iszkémia során mért véráramlás mértékével együtt kiváló, korai biomarker az infarktus nagyságának megítélésében. Továbbá a PIT-ek amplitúdója és morfológiája információt hordoz az agyszövet hemodinamikai és funkcionális állapotáról.

4.1 A PIT-ek és a DC potenciálváltozások közötti kapcsoltság foka

Ahogy azt korábban említettük (2.2.), a PIT-ek felismerésének elveit már korábban kidolgoztuk (Luckl et al 2008; Luckl et al 2009). Mint következő lépés, tudni szeretnénk volna, a PIT-ek és a „golden standard”-nak minősülő CSD-k közötti kapcsoltság fokát. Nagyszámú állatkísérletben azt találtuk, hogy a kapcsoltság igen nagyfokú, mintegy 93%.

4.2 A PIT-ek számának prediktív értéke a hisztológiai kimenetelt illetően

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a CSD-k jelentős szerepet játszanak a szöveti károsodás progressziójában fokális agyi iszkémiában. (Dijkhuizen et al 1999; Hossmann 1996; Nakamura et al 2010; Shin et al 2006). Hasonlóképp, a filament okklúziós kísérletek post-hoc analízisét elvégezve azt találtuk, hogy a PIT-ek száma szignifikánsan ($p < 0.01$) magasabb azokban az állatokban, amelyekben jelentős nagyságú infarktus alakult ki. A binomiális regressziós analízis kimutatta, hogy a különböző áramlási paraméterek között, a PIT-ek száma a legjobb biomarker, azonban ennek ellenére prediktív értéke nem kielégítő. Ugyanakkor, ha az iszkémia során mért átlag véráramlás mértékével kombináljuk, akkor egy nagyon pontos prediktor lesz. Az adataink azt sugallják, hogy a penumbra egy esetlegesen jobb kollaterális keringés mellett is rizikónak van kitéve, ha nagyszámú CSD halad át rajta. Ellenkezőleg, az agyszövet egy súlyosabb fokú iszkémiát is képes túlélni, ha a rajta áthaladó CSD-k száma csekély. A CSD mellett a perfúziós deficit jelentőségét a lézió nagysága szempontjából egy újabb közleményben is ismertették (Dreier et al., 2013).

Egy korábbi tanulmányunk szintén, indirekt módon ad bizonyosságot arra, hogy a PIT-ek alkalmasak a kimenetel megbecslésére. Két különböző anesztetikum hatását hasonlítottuk össze filament okklúzió során. (Luckl et al., 2008). Nagyobb számú PIT-t, és ennél fogva nagyobb infarktust észleltünk α -chloralose használata során, mint az izoflurán altatott

állatokban. Hasonló konklúzióra jutottak más tanulmányokban is (Saito et al., 1997, Takeda et al., 2011).

4.3 A PIT-ek amplitúdójának és morfológiájának prediktív értéke

A PIT-ek morfológiai heterogenitását két különböző ischémia modellben tanulmányoztuk. Az MCA disztális okklúziója elsősorban a fronto-parietalis lebenyekben okoz károsodást, míg az ér proximális okklúziója (filament okklúzió) sokkal nagyobb területeket érint (basalis ganglion, frontális, parietális és temporális lebeny). Az MCA disztális okklúziója során a koponyacsontot egy 6x6 mm-es területen vékonyítottuk el, amely lehetővé tette számunkra, hogy mind a magot, a penumbra-t és a peri-iszkémiás területeket egyaránt vizsgálhassuk. Hasonló nagyságú „koponyaablakot” használva vizsgáltuk a penumbra és a peri-ischémiás régió egy részét filament okklúzió során. Jobb véráramlás, nagyobb amplitúdó együttesen a hiperémiás jellegű (I. és II. típus) áramlási tranziensekkel a peri-iszkémiás területekre jellemző. A véráramlás gyakori megfordulása (steal a kollaterálisokon keresztül) az artériákban arra utal, hogy az artériák közötti anasztomózis aktív/funkcionális (Pinard et al., 2002). Ezzel szemben, alacsonyabb véráramlás, kisebb amplitúdók és hipoperfúzió jellegű áramlási tranziensek (IV., V. típus) nagyobb előfordulása jellemző a penumbra-ra, ott is elsősorban a maghoz közel fekvő területekre. Hasonlóan, Kumagai és munkatársai (2011) arról számoltak be, hogy monofázisos, áramláscsökkenés jellemző a penumbra maghoz közeli részein, míg attól távolodva a tranziensek egyre inkább bifázisosak ill. hiperémiásak. Az áramlási tranziensek hasonló térbeli heterogenitását írták le további tanulmányok patkányban (Nakamura et al 2010; Takeda et al 2011) ill. macskában (Strong et al., 2007).

4.6 A PIT-ek, mint lehetséges biomarkerek a klinikai kutatásban

Évtizedeken keresztül tartotta magát az a tévhit, hogy a CSD-k feltehetőleg nem játszanak szerepet a humán, agyi károsodások kialakulásában. A szkepticizmus egyik oka az volt, hogy nem tudtak a betegekben depolarizációs hullámokat non-invazív módon észlelni (Back et al., 2000). Az elmúlt években a COSBID (Co-Operative Study on Brain Injury Depolarizations, www.cosbid.org) csoport tevékenysége révén sikerült zárt koponyasérülés (Hartings et al., 2008), subarachnoidális vérzésben (Dreier et al 2009) valamint malignus MCA thrombosis (Dohmen et al., 2008) során a betegekben invazív módon CSD-t regisztrálni. A CSD-vel kapcsolatos egyre szaporodó ismereteink segítenek jobban megismerni eme kórképek patofiziológiáját. A CSD-k detektálásának elsődleges haszna abban nyilvánul meg, hogy esélyt ad terápia alkalmazására az érintett betegekben. Azonban először meg kell állapítani,

hogy mekkora számú/hosszúságú CSD káros. Vizsgálni kell, hogy a CSD-k valóban a kedvezőtlen kimenetellel vannak-e összefüggésben, függetlenül más klasszikus rizikófaktortól (Lauritzen et al., 2011). Egy másik irányba lehetne a kutatásnak olyan vegyületek kifejlesztése és tesztelése, amelyek gátolják a CSD-k terjedését, ill. csökkentik káros hatásait. Például egy új tanulmány szerint a ketamin és egyéb NMDA antagonisták hatásos terápiaként szolgálhatnak (Hertle et al., 2012). Fontos megjegyezni, hogy a jelenlegi módszerek invazív jellege (kraniotómia) gátolja az indikáció bővítését a tanulmányokban. A CSD-k non-invazív észlelése lehetővé tenné a klinikusok számára a sokkal nagyobb betegpopuláció (pl. összes ischaemiás stroke vagy enyhe koponyasérülés) vizsgálatát, ráadásul késedelem nélkül, közvetlenül a kiváltó esemény után. A jövőben a transzkraniális optikai képalkotó technikák, mint pl. a diffúz korrelációs spektroszkópia vagy (Durduran et al 2010) vagy az ultrahang által módosított infravörös közeli spektroszkópia (Schytz et al., 2012) megoldást jelenthet eme cél megvalósításában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet nyilvánítom ki témavezetőmnek, Bari Ferenc professzor Úrnak, akinek tanácsai, útmutatása és segítőkész hozzáállása alapvetően hozzájárult ahhoz, hogy a kutatási eredményeimet az értekezésben összefoglalva bemutathattam.

Hálámat szeretném kifejezni Joel H. Greenberg professzor Úrnak (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), hogy lehetőséget kaphattam laboratóriumában a stroke állatkísérletes modelljeinek elsajátítására. Útmutatásaival és türelmével nagyban elősegítette vizsgálataim sikeres kivitelezését és az eredmények publikálását.

Köszönettel tartozom Jens P. Dreier professzor Úrnak (Charité Universitätsmedizin, Berlin, Németország), jelenlegi főnökömnek, aki lehetővé tette, hogy a kutatócsoportjához csatlakozva az állat és klinikai kísérletek tapasztalatai révén tovább mélyíthettem a kúszó depolarizációkkal kapcsolatos tudományos ismereteimet. Értékes tanácsaival hozzájárult a tézis megírásához.

Köszönöm Gallyas Ferenc professzor Úrnak (Idegsebészeti Klinika, POTE, Pécs) és Büki András professzor Úrnak (Idegsebészeti Klinika, POTE, Pécs), akik lehetővé tették, hogy laboratóriumokban megismerkedjek a tudományos munka alapjaival és támogattak az első lépések megtétele során.

Köszönettel és hálával tartozom kollégáimnak, szerzőtársaimnak. Chao Zhou PhD, Wesley Baker PhD, Turgut Durduran PhD, Kövesdi Erzsébet PhD, Sebastian Major MD, Ana Ferreira-Oliveira PhD és Dirk Wiesenthal szakmai hozzáértésükkel és baráti támogatásukkal hozzájárultak a kísérletek sikeres kivitelezéséhez.

Hálásan köszönöm Családomnak munkám során mindvégig nyújtott szeretetüket, türelmüket és folyamatos támogatásukat.

Jelen kutatási eredmények megjelenését a TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0052 számú projekt támogatta.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

I. A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Luckl J**, Zhou C, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. Characterization of peri-infarct flow transients with laser speckle and laser Doppler during middle cerebral artery occlusion in rat. J Neurosci Res. 2009 Apr; 87 (5):1219-29

IF: 2.986

2. **Luckl J**, Baker W, Sun ZH, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. The biological effect of contralateral forepaw stimulation in rat focal cerebral ischemia: a multispectral optical imaging study. Front. Neuroenergetics. 2010 Jul 30; 2.

IF: kiszámítása folyamatban

3. **Lückl J**, Dreier JP, Szabados T, Wiesenthal D, Bari F, Greenberg JH. Peri-infarct flow transients predict outcome in rat focal brain ischemia. Neuroscience. 2012 Dec; 226:197-207.

IF: 3.122

II. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Lückl J**, Farkas O, Pál J, Kövesdi E, Czeiter E, Szellár D, Dóczi T, Komoly S, Büki A. Biomarkerek szerepe koponyasérülésben/Biomarkers in traumatic brain injury. Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle. 2007 Jul 30;60(7-8):284-94.

IF: 0

2. **Luckl J**, Keating J, Greenberg JH. Alpha-chloralose is a suitable anesthetic for chronic focal cerebral ischemia studies in the rat: A comparative study. Brain Res. 2008 Jan 29;1191:157-67

IF: 2.494

3. Czeiter E, Pal J, Kovesdi E, Bukovics P, **Luckl J**, Doczi T, Buki A. Traumatic axonal injury in the spinal cord evoked by traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2008 Mar; 25(3):205-13.

IF: 3.528

4. Zhou C, Shimazu T, Durduran T, **Luckl J**, Kimberg DY, Yu G, Chen XH, Detre JA, Yodh AG, Greenberg JH. Acute functional recovery of cerebral blood flow following forebrain ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 2008 Jul; 28(7):1275-84

IF: 5.741

5. Kövesdi E, **Lückl J**, Bukovics P, Farkas O, Pál J, Czeiter E, Szellár D, Dóczy T, Komoly S, Büki A. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. Acta Neurochir. 2010 Jan; 152(1): 1-17

IF: 1.329

6. Ferreira A, Milakara D, Alam M, Jorks D, Major S, Hartings J, **Lückl J**, Martus P, Graf R, Dohmen Ch, Bohner, G, Woitzik J, Dreier J. Experimental and preliminary clinical evidence of an ischemic zone with prolonged negative dc shifts surrounded by a normally perfused tissue belt with persistent electrocorticographic depression. J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Aug; 30(8):1504-19.

IF: 4,522

7. Kövesdi E, Bukovics P, Besson V, Nyirádi J, **Lückl J**, Pál J, Sümegi B, Dóczy T, Hernádi I, Büki A. A novel PARP- inhibitor L-2286 in a rat model of impact acceleration head injury: immuno-histochemical and behavioral study. Int. J Mol Sci. 2010 Mar 26; 11(4):1253-68

IF: 2,279

Összesített IF: 26.0

III. A TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ KONGRESSZUSI PREZENTÁCIÓK

1. **Lückl J**, Major S, Khojasteh U, Dreier JP. Quest for electrophysiological biomarkers in stroke translational research. Brain'13, Shanghai 2013, Kína
2. **Lückl J**, Dreier JP, Szabados T, Wiesenthal D, Bari F, Greenberg JH. Peri-infarct flow transients predict outcome in rat focal brain ischemia. X. Conference of the Hungarian Stroke Society, Miskolc 2011, Magyarország
3. **Lückl J**, Baker W, Sun ZH, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. Parameters of flow and oxyhemoglobin transients show spatial heterogeneity in rat focal brain ischemia. Brain'11, Barcelona 2011, Spanyolország
4. **Lückl J**, Dreier JP, Szabados T, Wiesenthal D, Bari F, Greenberg JH. Flow transients predict outcome in rat focal brain ischemia. Brain'11, Barcelona 2011, Spanyolország
5. **Lückl J**, Baker W, Sun ZH, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. Contralateral forepaw stimulation increases the incidence of hyperemic flow transients in focal ischemia in rat. Brain'09, Chicago 2009, Amerikai Egyesült Államok
6. **Lückl J**, Zhou C, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH. Simultaneous monitoring of peri-infarct flow transients with laser speckle and laser Doppler during middle cerebral artery occlusion in rat. International Stroke Conference, New Orleans 2008, Amerikai Egyesült Államok

IRODALOMJEGYZÉK

- Back T, Hirsch JG, Szabo K, Gass A (2000) Failure to demonstrate peri-infarct depolarizations by repetitive MR diffusion imaging in acute human stroke. *Stroke* 31:2901-2906.
- Bari F, Louis TM, Busija DW (1998) Effects of ischemia on cerebral arteriolar dilation to arterial hypoxia in piglets. *Stroke* 29:222-227; discussion 227-228.
- Bari F, Paprika D (2000) Changes in cerebrovascular reactivity after stimulation and depletion of sensory fibers in rats. In: *Ischemic Blood Flow in the Brain*(Fukuuchi, Y. T., M.; Koto, A., ed), pp 289-295 Tokyo: Springer Publishers.
- Briers JD (2001) Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas* 22:R35-66.
- Collewijn H, Harreveld AV (1966) Membrane potential of cerebral cortical cells during reading depression and asyxia. *Exp Neurol* 15:425-436.
- Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW (1994) Calcitonin gene-related peptide promotes cerebrovascular dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol* 266:H1095-1102.
- Colonna DM, Meng W, Deal DD, Gowda M, Busija DW (1997) Neuronal NO promotes cerebral cortical hyperemia during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol* 272:H1315-1322.
- Czeh G, Aitken PG, Somjen GG (1993) Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization. *Brain Res* 632:195-208.
- Dijkhuizen RM, Beekwilder JP, van der Worp HB, Berkelbach van der Sprenkel JW, Tulleken KA, Nicolay K (1999) Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain. *Brain Res* 840:194-205.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R (2008) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63:720-728.
- Dreier JP, Korner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhaupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) 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. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:978-990.
- Dreier JP, Victorov IV, Petzold GC, Major S, Windmuller O, Fernandez-Klett F, Kandasamy M, Dirnagl U, Priller J (2013) Electrochemical Failure of the Brain Cortex Is More Deleterious When it Is Accompanied by Low Perfusion. *Stroke* 44:490-496.
- Drenckhahn C, Winkler MK, Major S, Scheel M, Kang EJ, Pinczolits A, Grozea C, Hartings JA, Woitzik J, Dreier JP (2012) Correlates of spreading depolarization in human scalp electroencephalography. *Brain* 135:853-868.
- Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA (2001) Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:195-201.
- Durduran T, Burnett MG, Yu G, Zhou C, Furuya D, Yodh AG, Detre JA, Greenberg JH (2004) Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:518-525.
- Durduran T, Zhou C, Buckley EM, Kim MN, Yu G, Choe R, Gaynor JW, Spray TL, Durning SM, Mason SE, Montenegro LM, Nicolson SC, Zimmerman RA, Putt ME, Wang J, Greenberg JH, Detre JA, Yodh AG, Licht DJ (2010) Optical measurement of cerebral hemodynamics and oxygen metabolism in neonates with congenital heart defects. *J Biomed Opt* 15:037004.
- Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, Maas AI, Woitzik J, Sakowitz O, Mathern B, Roozenbeek B, Lingsma H, Dreier JP, Puccio AM, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ (2011) Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol* 10:1058-1064.
- Hartings JA, Gugliotta M, Gilman C, Strong AJ, Tortella FC, Bullock MR (2008) Repetitive cortical spreading depolarizations in a case of severe brain trauma. *Neurol Res* 30:876-882.
- Hertle DN, Dreier JP, Woitzik J, Hartings JA, Bullock R, Okonkwo DO, Shutter LA, Videon S, Strong AJ, Kowoll C, Dohmen C, Diedler J, Veltkamp R, Bruckner T, Unterberg AW,

- Sakowitz OW (2012) Effect of analgesics and sedatives on the occurrence of spreading depolarizations accompanying acute brain injury. *Brain* 135:2390-2398.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hossmann KA (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:195-208.
- Iijima T, Mies G, Hossmann KA (1992) Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:727-733.
- Kow LM, van Harreveld A (1972) Ion and water movements in isolated chicken retinas during spreading depression. *Neurobiology* 2:61-69.
- Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1):199-210.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ (2011) Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:17-35.
- Leao AA (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390.
- Luckl J, Baker W, Sun ZH, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH (2010) The biological effect of contralateral forepaw stimulation in rat focal cerebral ischemia: a multispectral optical imaging study. *Front Neuroenergetics* 2.
- Luckl J, Zhou C, Durduran T, Yodh AG, Greenberg JH (2009) Characterization of periinfarct flow transients with laser speckle and Doppler after middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurosci Res* 87:1219-1229.
- Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM (1996) Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:221-226.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4:709-711.
- Mori S, Miller WH, Tomita T (1976) Microelectrode study of spreading depression (SD) in frog retina--general observations of field potential associated with SD. *Jpn J Physiol* 26:203-217.
- Muller M, Somjen GG (2000) Na(+) and K(+) concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83:735-745.
- Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sue M, Kracht L, Hashemi P, Bhatia R, Yoshimine T, Dreier JP, Dunn AK, Graf R (2010) Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain* 133:1994-2006.
- Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449:395-398.
- Obrig H, Villringer A (2003) Beyond the visible--imaging the human brain with light. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1-18.
- Pinard E, Nallet H, MacKenzie ET, Seylaz J, Roussel S (2002) Penumbra microcirculatory changes associated with peri-infarct depolarizations in the rat. *Stroke* 33:606-612.
- Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U (1998) Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 274:H1979-1987.
- Saito R, Graf R, Hubel K, Fujita T, Rosner G, Heiss WD (1997) Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:857-864.
- Schytz HW, Guo S, Jensen LT, Kamar M, Nini A, Gress DR, Ashina M (2012) A new technology for detecting cerebral blood flow: a comparative study of ultrasound tagged NIRS and ¹³³Xe-SPECT. *Neurocrit Care* 17:139-145.
- Shibata M, Leffler CW, Busija DW (1992) Pial arteriolar constriction following cortical spreading depression is mediated by prostanoids. *Brain Res* 572:190-197.
- Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C (2006) Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1018-1030.

- Somjen GG, Aitken PG (1984) The ionic and metabolic responses associated with neuronal depression of Leao's type in cerebral cortex and in hippocampal formation. *An Acad Bras Cienc* 56:495-504.
- Sonn J, Mayevsky A (2012) Responses to Cortical Spreading Depression under Oxygen Deficiency. *Open Neurol J* 6:6-17.
- Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, Virley DJ, Lloyd A, Irving EA, Nagafuji T, Ninomiya M, Nakamura H, Dunn AK, Graf R (2007) Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain* 130:995-1008.
- Strong AJ, Bezzina EL, Anderson PJ, Boutelle MG, Hopwood SE, Dunn AK (2006) Evaluation of laser speckle flowmetry for imaging cortical perfusion in experimental stroke studies: quantitation of perfusion and detection of peri-infarct depolarisations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:645-653.
- Sukhotinsky I, Dilekoz E, Moskowitz MA, Ayata C (2008) Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1369-1376.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, Kasischke KA, Nedergaard M (2007) Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci* 10:754-762.
- Takeda Y, Zhao L, Jacewicz M, Pulsinelli WA, Nowak TS, Jr. (2011) Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1863-1873.
- Yanamoto H, Miyamoto S, Tohnai N, Nagata I, Xue JH, Nakano Y, Nakajo Y, Kikuchi H (2005) Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putamen and cortex. *Stroke* 36:1544-1550.
- Zhou C, Shimazu T, Durduran T, Luckl J, Kimberg DY, Yu G, Chen XH, Detre JA, Yodh AG, Greenberg JH (2008) Acute functional recovery of cerebral blood flow after forebrain ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1275-1284.