

A molekuláris hidrogén neuroprotektív hatásának vizsgálata új hipoxiás-iszkémiás encefalopátia transzlációs malac modellben

PhD. értekezés tézisei

Dr. Németh János

Témavezető:

Dr. Domoki Ferenc



Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2017

BEVEZETÉS

A hipoxiás-iszkémiás enkefalopátia (HIE) olyan akut/szubakut agyi károsodás, melyet az újszülöttnben a perinatális időszakban bekövetkező aszfixia (perinatális aszfixia, PA) hoz létre. A PA kialakulása során a gázcsere zavar következtében egyre súlyosbodó hipoxia, hiperkapnia és acidózis alakul ki, mely hemodinamikai ill. mechanikai okok miatt az agyi véráramlás csökkenésével is társulhat. A PA perinatális klinikai felismerése nehéz, hiszen bizonyos mértékű PA a legtöbb hüvelyi szülés során kialakulhat, így a klinikai gyakorlatban a HIE-hez vezető súlyos PA klinikai diagnózisa a következő feltételek együttes megléte esetén állítható fel: 1) a köldökartériából nyert vérmintában mért súlyos acidózis ($\text{pH} < 7.0$, bázis hiány > 12 mmol/l), 2) 5 percen túl mért alacsony (0-3) Apgar pontszám, 3) idegrendszeri tünetek (tudatzavar, görcstevékenység, izomhipotónia) és 4) sokszervi elégtelenség jelei. A nemzetközi becslések szerint a súlyos PA kb. két millió újszülöttet érint évente világszerte. A PA/HIE kimenetele igen változatos, a PA/HIE által okozott halálesetek felelősek a csecsemőhalandóság legnagyobb hányadáért (~6-800.000 újszülött/év, ~23%), a HIE akut szak túlélőiben pedig az idegrendszeri maradványtünetek folyamatos spektruma figyelhető meg. Ez a spektrum a teljes tünetmentességtől az enyhébb kognitív-szociális (pl. tanulási v. figyelemzavaros) tünetcsoportokon, epilepszia szindrómákon keresztül a súlyos mentális retardáción át a súlyos szenzomotoros deficittel járó cerebrális parézis (CP) kialakulásáig, sőt akár a késői mortalitásig is terjed. A HIE betegek mintegy fele (20-50%, ~500.000 újszülött/év) marad súlyos fogyatékkal élő a gyermekkor végére. A HIE mortalitásának és a súlyos fogyatékkal túlélők arányának csökkentése a gyermekgyógyászat egyik legfontosabb kihívása.

Egy évtizeddel ezelőtt még csak a tüneti intenzív terápia állt rendelkezésre a HIE kezelésére. Mára azonban a testhűtés, a terápiás hipotermia (TH) is elérhetővé vált. A TH az egyetlen engedélyezett neuroprotektív kezelés, mely bizonyítottan csökkenti a HIE mortalitását és a maradványtünetek súlyosságát. Sajnos a TH hatékonysága sem teljes, ezen kívül a kezelésnek súlyos mellékhatásai lehetnek (pl. alacsony szívfrekvencia és hipotenzio, hiperkalémia, véralvadási zavarok). További neuroprotektív terápiák kidolgozására van tehát szükség, melyek a TH-t kiegészítik, esetleg helyettesíthetik.

A klinikai célok elérésében a felfedező kutatások és azon belül az *in vivo* állapotmodellek jelentősége vitathatatlan, hiszen azok egyaránt lehetőséget biztosítanak a PA/HIE molekuláris patomechanizmusainak feltérképezésére és a neuroprotektív célzó terápiák tanulmányozására is. A PA/HIE tanulmányozásának egyik legkritikusabb pontja a helyes állapotmodell megválasztása ahhoz, hogy a PA/HIE klinikai képéből már jól ismert valamennyi metabolikus (pl. O_2 szaturáció, vércukorszint, laktátszint) és funkcionális (pl. szívfrekvencia, vérnyomás, agyi elektromos aktivitás) változás megjelenjen a modellben is. Az elmúlt években nagyszámú PA/HIE állapotmodellt közöltek az irodalomban, részben a humán PA etiológiájának heterogenitását, részben pedig a kutatók hipotéziseit tükrözve. A PA/HIE molekuláris mechanizmusainak felderítéséhez elsősorban a kisállatmodellek (pl. tengerimalac, patkány, nyúl, egér) járultak hozzá, míg a nagyállatmodellek (pl. bárány, kutya, majom és malac) előnye a szélesebb körű fiziológiai monitorizálási lehetőségekben és a

nagyobb klinikai translációs potenciálban rejtett. Az állatmodellek közül az újszülött sertés vált talán az érett humán újszülött egyik legfontosabb nagyállat modelljévé. A faj előnye, hogy egyrészt viszonylag könnyen beszerezhető, másrészt az újszülött sertés központi idegrendszeri fejlettsége, agyi metabolizmusa a születéskor sok hasonlóságot mutat az érett humán újszülöttével. Ezzel a fajjal is számos PA/HIE modellt közöltek, csak néhány példát említve: szelektív globális agyi iszkémia előidézése koponyaűri nyomásfokozással, aszfixia kialakítása a lélegeztetés felfüggesztésével, kétoldali légmell kialakításával, vagy szívmegeállással. Ma leggyakrabban hipoxiás gázelegy lélegeztetésével hoznak létre HIE-t, melyet egyes kutatócsoportok reverzibilis kétoldali karotisz artéria okklúzióval társítanak. Azonban ezekben a modellekben nem mindig mutatható ki hiperkapnia, noha ez fontos komponense a PA-nak, ugyanakkor a mechanikus érelzárás humán patofiziológiai relevanciája is megkérdőjelezhető.

A HIE súlyosságának csökkentését célzó ideális neuroprotektív kezelés tulajdonságai a következők lennének: 1) potens neuroprotektív translációs PA/HIE állatmodellekben majd klinikai vizsgálatokban, 2) olcsó és egyszerű klinikai alkalmazás, 3) nincs/ceseély mellékhatás, 4) penetrációs képesség a vér-agy gáton keresztül, és végül 5) gyors clearance. A PA/HIE állatmodellekben számos neuroprotektív terápiás eljárás, köztük a ma már humán terápiában is alkalmazott TH bizonyult hatásosnak, de ezek közül néhány az észlett mellékhatások miatt (pl. nicardipin, magnézium) nem jutott el a klinikai tesztekig. Jelenleg is több aktív kutatási projektben folynak vizsgálatok új neuroprotektív beavatkozások hatékonyságának bizonyítására. A xenon (Xe) lélegeztetés TH-val kombinálva additív neuroprotektív hatást mutatott újszülött PA/HIE sertésmoделlben, azonban e drága nemesgázzal végzett klinikai vizsgálatok eddig nem igazolták, hogy a HIE kimenetele jobb lenne a csupán TH-val kezelt újszülöttekhez képest. A Xe igen drága, ami rutinszerű alkalmazását a PA/HIE-vel érintett újszülöttek többségét adó fejlődő országokban gyakorlatilag kizárja. A xantin-oxidáz gátló allopurinol a klinikai vizsgálatokban csak az enyhébb HIE esetekben hozott kedvező eredményeket humán aszfixiás újszülöttekben. A biztató állatkísérletes eredmények alapján várható a klinikai vizsgálatok megkezdése néhány további gyógyszer esetében. Ilyen az antioxidáns hatású N-acetilcisztein, mely a paracetamol mérgezés ellenszere, továbbá az endogén anyagok közül a melatonin és az eritropoetin, melyek gyulladásgátló hatást fejtenek ki, ill. csökkentik az apoptotikus idegsejtkárosodást.

Munkacsoportunk kutatásainak középpontjába a molekuláris hidrogén (H₂) neuroprotektív hatásának vizsgálatát állította. 2007-ben a Nature című folyóiratban jelent meg Ohsawa és mtsai. közleménye, miszerint 2-4% H₂ belélegeztetése jelentősen csökkenti az elhalt agyterület nagyságát felnőtt patkány szélütés modellben. Laboratóriumunk korábbi eredményei szerint újszülött malac HIE modellben a H₂ csökkentette az ún. neurovaszkuláris diszfunkciót PA után, azaz csökkentette az agyi erek válaszkészségének károsodását különböző vazoaktív ingerekre. A H₂ neuroprotektív hatásának feltárását azonban korábbi vizsgálatainkban megnehezítette, hogy az alkalmazott PA csak viszonylag kismértékű neuronkárosodáshoz vezetett, így szignifikáns jótékony hatást a legtöbb agyi területen nem lehetett kimutatni.

Folytatva a H₂ neuroprotektív hatásának vizsgálatát, jelen tézis célkitűzései a következők voltak:

- 1) Megvizsgálni, hogy az irodalomban eddig közölt újszülött sertés PA/HIE modellek milyen hatással vannak az agykérgi mikrocirkulációra, különös tekintettel arra, hogy a karotis artéria kétoldali leszorítása csökkenti-e az agykérgi perfúziót.
- 2) A tapasztalatok alapján létrehozni és jellemezni egy olyan új PA/HIE modellt, mely minél jobban megközelíti a PA humán klinikumban megfigyelt fenotípusát. A modell jellemzése során leírni a PA/HIE metabolikus, mikrocirkulációs, hemodinamikai, és az agyi elektromos aktivitásra gyakorolt hatásait, valamint meghatározni a PA/HIE során az agykérgi interstitium pH változásait.
- 3) Az új PA/HIE modell felhasználásával megvizsgálni a H₂ neuroprotektív hatását elektroencefalográfia (EEG) és a neuronális károsodás neuropatológiai kimutatásának segítségével.
- 4) Megvizsgálni, hogy a H₂ csökkenti-e az oxidatív idegsejtkárosodást az alkalmazott PA/HIE modellben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket hím, újszülött (~1 napos) sertéseken ($m=1.5-2.5$ kg, $n=48$) végeztük. Az ip. tiopentál altatást követően a malacokat tracheotomizáltuk, intubáltuk, majd orvosi szintetikus levegővel ($FiO_2=0.21$) mesterségesen lélegeztettük (légzésszám: 30-35/perc, belégzési csúcsnyomás: 120-135 vízmm) a kísérlet teljes ideje alatt. A jobb oldali femorális vénába egy katéter behelyezését követően folyamatos morfin-midazolam altatást és folyadékpótlást biztosítottunk a kísérletek végéig. Az artériás vérnyomást invazív mérési technikával, a karotisz artériába helyezett kanül segítségével mértük, kivéve abban a kísérleti csoportban ahol a karotisz artéria leszorítás hatását vizsgáltuk, ott a femorális artériát kanuláltuk. Ebben a kísérleti csoportban a karotisz artériák köré 1-1 felfújható mandzsettát helyeztünk az erek leszorítása céljából.

Minden kísérleti csoportban őrzőmonitor segítségével, a kísérletek teljes ideje alatt monitoroztuk és rögzítettük az EKG-t, a vérnyomást, a szívfrekvencia és a bőr O_2 szaturáció értékeit. Szervo-kontrollált melegítő segítségével állandó ($38.5 \pm 0.5^\circ C$) maghőmérsékletet biztosítottunk. Artériás vérmintákból rendszeresen ellenőriztük a vérgáz és a metabolikus értékeket.

Az általános műtéti beavatkozás után a malacokat 6 kísérleti csoportba soroltuk:

1. csoport ($n=7$), karotisz artéria kétoldali leszorításának (2-2 perc) hatásait vizsgáltuk lézer foltinterferencia képalkotással (laser speckle contrast imaging, LSCI) különböző lélegeztetési protokollok alatt.
2. csoport ($n=7$) kontrol csoport; műtéti protokoll elvégzése után 24 órát túlélt malacok.
3. csoport ($n=8$) aszfixiás csoport; a PA-t 6% O_2 -20% CO_2 gázkeverék 20 perces lélegeztetésével indukáltuk, majd 24 órán keresztül levegővel lélegeztettük a malacokat.
4. csoport ($n=8$) aszfixia+hidrogén csoport, a molekuláris H_2 neuroprotektív hatásának vizsgálatára az aszfixiát követő 4 órában H_2 gázt tartalmazó levegővel, az azt követő 20 órában pedig orvosi szintetikus levegővel lélegeztettük a malacokat.
5. csoport ($n=5$) aszfixia+LSCI csoport: az aszfixia agykérgi mikrocirkulációra gyakorolt hatását vizsgáltuk LSCI-vel.
6. csoport ($n=13$) agykérgi intersticiális pH méréseket végeztünk a PA/HIE modellben.

2. LSCI és képanalízis

A szemikvantitativ módszer lényege, hogy segítségével meghatározható a mintáról visszavert lézerefény szórási interferencia-mintázat autokorrelációs ideje (τ), melynek reciproka ($1/\tau$) arányos a mozgó részek (vörösvértestek) áramlási sebességével. Az 1. és az 5. csoportban vizsgált malacok fejét sztereotaxiás keretbe rögzítettük, majd kraniotómia és a dura mater eltávolítás után a parietális koponyacsontba zárt koponyaablakot implantáltunk. A koponyaablakba épített szondákon keresztül a szubarachnoidális teret melegített, mesterséges cerebrospinalis folyadékkal töltöttük fel. A képalkotást a munkacsoportunk közreműködésével fejlesztett, egyedi tervezésű operációs mikroszkóphoz csatlakoztatott LSCI eszközzel végeztük. Az agykéreg felszínét diódlázerrel ($\lambda=808$ nm, 200 mW) világítottuk meg, a visszavert fényt a mikroszkóphoz csatlakoztatott

monokróm kamerával képsorozatokon rögzítettük (1 Hz, 2 msec). Az így készült képeket offline, a munkacsoport által fejlesztett LabView háttérű szoftver segítségével értékeltük: minden képsorozat a piális artériákon (1. csoport), ill. a felszíni erek által nem fedett agyi parenchimán (1. és 5. csoportok) 4-4 vizsgálati területet (region of interest, ROI; 5x5 pixel, ~100 μm^2) jelöltünk ki. Az egyes ROI-ban meghatározott $1/\tau$ értékeket állatonként átlagoltuk, az alaphoz normalizáltuk majd a relatív változásukat fejeztük ki az alapértékekhez képest. A piális érátmérő változásokat is a saját tervezésű szoftver segítségével határoztuk meg.

3. Karotisz artéria leszorítás

Az agykérgi perfúziót LSCI segítségével vizsgáltuk. Az 1. csoportban a kísérlet során az agykérgi áramlást alaphelyzetben, hipoxia alatt ($\text{FiO}_2=0.1$) majd a lélegeztetés felfüggesztésével kiváltott aszfixia alatt is regisztráltuk. A karotisz artériákra felhelyezett mandzsetták felfújásával 2-2 perces okklúziót hoztunk létre alaphelyzetben, majd a hipoxia 5. és 30. percében.

4. PA/HIE kísérleti csoportok

Az altatott malacokat nyitott inkubátorba helyeztük (2., 3. és 4. csoport). A korábban ismertetett paraméterek mérése mellett, ezeknél az állatoknál a túlélés 12. órájában hólyagpunkciót végeztünk, hogy eltávolítsuk a vizeletet, a fertőzések elkerülése érdekében a kísérlet kezdetén és a 12. órában iv. antibiotikumot (Penicillin+Gentamicin) adtunk. Az esetlegesen fellépő görcsöket iv. midazolam segítségével kezeltük. Az áthelyezést, instrumentálást és ellátást követő 1 órás stabilizálódás után a malacokat random 3 csoportba soroltuk: kontrol - 2. csoport, aszfixia - 3. csoport és aszfixia+hidrogénes - 4. csoport. Az aszfixiás csoportokban az aszfixiát egy hipoxiás-hiperkapniás (6% O_2 -20% CO_2) gázkeverék 20 perces lélegeztetésével idéztük elő, felezett (15/perc) légzésszám mellett. Az aszfixiás csoportot az inzultus után 24 órán keresztül levegővel (légzésszám: 30/perc), míg az aszfixia+hidrogénes csoportot a túlélés első 4 órájában molekuláris H_2 -t tartalmazó gázkeverékkel (2.1% H_2 , 21% O_2 , N_2), majd ezt követően levegővel lélegeztettük.

5. EEG

Az előzőekben ismertetett PA/HIE csoportjainkban a fronto-parietális és occipitális kéreg fölé szűrt szubkután elektródák segítségével rögzítettük az agyi elektromos aktivitást (impedancia: <5kOhm, áteresztő filterek: 1-70 Hz, mintavételezés: 250 Hz). Az adatokat offline, kétféle módszerrel elemeztük ki: 1) szemikvantitatív pontozással, és 2) teljesítménysűrűség (power) spektrum analízissel. A szemikvantitatív pontozáshoz az alap, majd minden megkezdett túlélési óra első 10 perces időintervallumában egy pontozási skála segítségével jellemeztük az EEG amplitúdóját és folyamatoságát, ahol az alacsony pontszámok (1-3) nagy- (>10 μV), míg a magas pontszámok (4-7) kis amplitúdójú (<10 μV) EEG aktivitásnak feleltethetők meg. A teljesítménysűrűség-spektrum analízishez ugyanezen 10 perces intervallumok EEG szakaszainak görbe alatti területét vizsgáltuk, és meghatároztuk az adott szakasz teljes spektrum nagyságát (μV^2), mely az individuális frekvenciák teljesítménysűrűség-spektrumának matematikai összegéből számolható ki.

6. Agykérgi pH mérések

A 6. csoport malacait is sztereotaxiás keretbe rögzítettük majd a parietális kéreg feletti kraniotómiát és dura eltávolítást követően pH szenzitív mikroelektrodot helyeztünk az agykéregbe 1-2 mm mélyre. A saját kezűleg készített ezüst/ezüstklorid referencia elektródot egy második kraniotómián keresztül a kontralaterális agykéregbe szúrunk. A mérések előtt a mikroelektrodot 3 különböző (pH: 6.1, 7.1 és 8.1) előmelegített, puffertelt pH oldatban kalibráltuk. A mikroelektrod és referencia elektród közötti feszültségkülönbséget felerősítettük, egyenárammá alakítottuk, vizualizáltuk és rögzítettük a WinEDR szoftver segítségével. A regisztrátumok kiértékelése offline történt: a kalibrációs pontokra egyenest illesztve meghatároztuk a görbe meredekségét és a potenciálkülönbséget egy pH skálán fejeztük ki. Mivel a módszer ismételt kalibráció nélkül csak korlátozott ideig biztosít pontos adatokat, így meghatározott időintervallumokban történt az agykérgi pH rögzítése: alapállapotban, aszfixia alatt, az aszfixiát követő 1-4 órában, ill. az azt követő túlélési periódus adott (8-14 és 20-24h között) időpontjaiban.

7. Szöveti értékelés

A karotisz artériákba vezetett katétereken keresztül a malacok agyát (2., 3. és 4. csoportok) hideg fiziológiás sóoldattal perfundáltuk 24 órával az aszfixia után. Az agyakat 2 hétig immerziósan fixáltuk 4°C, 4% paraformaldehid oldatban, majd a paraffinba ágyazott, 4 µm vastagságú metszeteken, hematoxylin-eozin festést követően meghatároztuk az agyi károsodás mértékét. Az agykérgi károsodást egy, az irodalomból származó neuropatológiai pontozással értékeltük ki: valamennyi (frontális, parietális, temporális, occipitális) lebenyben 20-20 egymást nem fedő látóteret (200x nagyítás) megvizsgálva meghatároztuk a legsúlyosabb sérülési (nincs<elszört<lamináris<teljes kéregre kiterjedő) mintázatot, majd ennek az előfordulása alapján (%/20 látóter) neuropatológiai pontszámokat (0-9) adtunk. A kisagyi Purkinje sejtek, törzsdúcok, talamusz és a hippokampális CA1 és CA3 régiók károsodását sejtszámlálással (200x nagyítás, 10,5,5,3,3 egymást nem fedő látóterek) értékeltük ki és %-ban adtuk meg a sérült neuronok arányát. Végezetül, hogy összehasonlítsuk jelen PA/HIE modellünket a munkacsoport korábban alkalmazott aszfixiás kísérleti modelljével (lélegeztetés 8 perces felfüggesztése), megismételtük a korábbi kísérleteinkből származó agykérgi minták kiértékelését a jelenlegi pontozási módszer segítségével.

8. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) immunhisztokémia

A 2., 3. és 4. csoport malacainak paraffinba ágyazott agymintáiból, szöveti mikroarray technikával, 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteken immunfestőautomatában, 8-OHdG immunhisztokémiai festést végeztünk. A metszeteket digitalizáltunk és sejtszámlálással meghatároztuk a 8-OHdG immunpozitív sejtmagok arányát a parietális kéregben és a hippokampusz CA1 régiójában.

9. Neuron specifikus enoláz (NSE) ELISA

A 2., 3. és 4. csoport malacaiból a kísérlet meghatározott időpontjaiban (alap, aszfixia 18. perce, túlélés 4. és 20. órája) ~1 ml artériás vért vettünk EDTA-val bevont centrifuga csövekbe, majd 40 µl proteáz inhibitor

koktéllal (gyártói ajánlás alapján) kiegészítve 2200 g-n, 4°C-n, 5 percig centrifugáltuk. Az így nyert plazmamintákat -80°C-n tároltuk a mérések elvégzéséig. A plazmák NSE tartalmát sertés specifikus ELISA kit és spektrofotométer ($\lambda=450$ nm) segítségével határoztuk meg.

10. Statisztikai analízis

Az adatokat egy-, illetve két szemponos, ismételt méréseket varianciaanalízissel elemeztük, *post hoc* tesztként Student-Newman-Keuls (SNK) tesztet alkalmaztunk. Nem parametrikus adatok esetén a Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk, SNK *post hoc* teszttel. Adatainkat átlag \pm átlag hibája (mean \pm S.E.M.) formában prezentáltuk és a $p<0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

1. Kétoldali karotisz artéria leszorítás hatásai az agykérgi véráramlásra

Kísérleteink kezdetén minden kísérleti csoport, valamennyi kísérleti állatának vitális paraméterei fiziológiás tartományban voltak, az 1. csoport értékei: rektális hőmérséklet: $38.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, O_2 szaturáció: $94 \pm 1\%$, artériás középnyomás: 79 ± 3 Hgmm és szívfrekvencia: 163 ± 1 /perc.

Az 1. csoportban alkalmazott hipoxiás lélegeztetés (35 perc; $\text{FiO}_2=0.1$) végére acidózis (pH_a : 7.42 ± 0.03 -ról 7.29 ± 0.04 -re) és hipoxia (P_aO_2 : 79 ± 8 -ról 22 ± 2 Hgmm-re) alakult ki, változatlan CO_2 szint (P_aCO_2 : 37 ± 7 -ről 37 ± 5 Hgmm-re) mellett. A levegővel történt reoxigenizáció normalizálta a vérgáz értékeket, majd az ezt követő aszfixiás stressz (lélegeztetés 7 perces felfüggesztése és az endotracheális tubus lezárása) súlyos acidózist (pH_a : 6.73 ± 0.02), hipoxiát (P_aO_2 : 14 ± 3 Hgmm) és hiperkapniát (P_aCO_2 : 87 ± 6 Hgmm) okozott, mely a reventiláció során rendeződött.

Az 1. kísérleti csoport állatain mért agykérgi alapáramlás nem változott a 2 perces, kétoldali artéria karotisz okklúzió hatására. A hipoxiás lélegeztetés hatására jelentős mértékű vazodilatáció és áramlásfokozódás jött létre, azonban a hiperémia nagyságát/lefolyását nem befolyásolta a hipoxiás inzultus 5. és 30. percében alkalmazott kétoldali karotisz artéria leszorítás.

Az aszfixia jelentős hipoperfúzióval járt, mely a reventiláció során normalizálódott.

2. A PA-s stressz jellemzése

A 20 perces aszfixiát bifázisos vérnyomás- és szívfrekvencia válasz jellemezte: az O_2 szaturáció csökkenésével mindkét paraméter először gyorsan emelkedett, majd az aszfixia végéig progresszív csökkenést mutatott, a reventiláció kezdetén pedig, ismét megemelkedett mindkét paraméter értéke. Fontos megemlíteni, hogy egyik állatban sem alakult ki súlyos hipotenzio (artériás középnyomás: < 50 Hgmm) a hipoxiás-hiperkapniás lélegeztetés során.

A stressz végén súlyos, a 4 aszfixiás csoport (3., 4., 5. és 6. csoport) között szignifikáns eltérést nem mutató acidózist (pH_a : 6.78 ± 0.02), hipoxiát (P_aO_2 : 26 ± 2 Hgmm) és hiperkapniát (P_aCO_2 : 119 ± 6 Hgmm) mértünk (3. csoport adatai). Ezt jelentős bázishiány (17.4 ± 5.0 mmol/l-es csökkenés), centrális deszaturáció (94 ± 5 %-ról 13 ± 4 %-ra), magas vércukorszint (4.2 ± 0.4 mmol/l-ről 9.3 ± 0.9 mmol/l-re) és laktátacidózis (1.6 ± 1.0 mmol/l-ről 10.3 ± 2.5 mmol/l-re) kísérte (5. csoport adatai).

Az EEG percek alatt izoelektromossá vált, az agykérgi véráramlás pedig (5. csoport) mérsékelten nőtt majd állandó szinten maradt a 20 perces stimulus végéig. Az agykérgi intersticiális pH (6. csoport) folyamatosan csökkent az aszfixia alatt (7.08 ± 0.02 -ről 5.75 ± 0.27 -re), mely 1 pH egységgel meghaladta az artériás vérben mért acidózis mértékét.

3. A HIE jellemzése

1-1 malacban (3. és 4. csoport) a túlélési periódus 8. és 12. órájában súlyos keringési elégtelenség lépett fel, mely 12.5%-s (2/16) mortalitási rátát eredményezett, így e malacok adatait nem tüntettük fel az eredményeinkben.

Az aszfixiát követő reventiláció az alkalmazott lélegeztető gáz összetételétől függetlenül, percek alatt helyreállította az O₂ szaturációt, melyet vérnyomás és szívfrekvencia emelkedés, valamint újabb agykérgi hiperémia (5. csoport) kísért. A megfigyelt vitális és vérgáz paraméterek a túlélés további szakaszában az élettani tartományokban maradtak, egyedül a szívfrekvencia volt a 3. csoportban szignifikánsan magasabb a 2. csoporttal szemben a túlélés.

Bár a vérplazma laktát szintje az aszfixia után 1 órával még mindig magas volt (6.4±2.4 mmol/l), a túlélés 4. órájára ez is rendeződött. A 2.1% H₂-t tartalmazó gázkeverékkel történő reventiláció fokozatosan helyreállította az agyi elektromos aktivitást a 4. csoport malacaiban, mely az alacsony EEG pontszámokban és a statisztikailag magasabb EEG teljesítményben nyilvánult meg. A 3. csoport 5 kísérleti állapotában az agyi elektromos tevékenység súlyosan lapos maradt (magas EEG pontszám, alacsony teljesítmény) és 2 állapotban (a 9. és 13. órában) görcstevékenység is kialakult a megfigyelési periódus végéig.

A 20 perces aszfixia nem befolyásolta a vérplazma NSE értékeit (az alap 96±7 %-a a 4. és 106±36 %-a a 20. órában) a 24 órás túlélési periódusban.

Végül, az agykérgi pH (6. csoport) is rendeződött az obszerváció 2. órájára és a későbbiekben mért értékek (8-14 és 20-24h között) nem mutattak szignifikáns eltéréseket az alapértékekhez képest.

4. Neuropathológia

A kontroll (2.) csoport malacainak szövettani metszeteiben csak elszórtan jelentek meg károsodott neuronok, melyek alacsony szövettani pontszámokat eredményeztek valamennyi lebenyben. Aszfixia hatására azonban (3. csoport) kiterjedt agykérgi károsodást tapasztaltunk, mely főleg lamináris vagy teljes kéregre kiterjedő formában jelentkezett és ezt nagyszámú sérült neuron kísérte a többi vizsgált agyi régióban is. 2.1% H₂-nel történő 4 órás lélegeztetés (4. csoport) szignifikánsan csökkentette az agykérgi károsodás mértékét, és jelentős mértékű neuroprotekciónak eredményezett a többi vizsgált agyi régióban is.

Fontos kiemelni, hogy jelen PA/HIE modellünkben szignifikánsan súlyosabb fokú agykérgi károsodást tudunk kimutatni, mint a korábban alkalmazott 8 perc aszfixiás – neuropatológiailag újra kiértékelt – csoportban (a négy kérgi régióban meghatározott pontszám összege 20 perc PA (3. csoport) vs. 8 perc PA: 32;20;36 vs. 17;10;21; medián; 25–75 percentilis).

8-OHdG immunhisztokémiai analízisünk a 3. csoport malacainak agyszövet metszetein intenzív magi festődést mutatott a parietális (73±7 %) és CA1 (46±14 %) régiókban, míg a 2.1% H₂-nel történt lélegeztetés (4. csoport) jelentősen csökkentette (34±9 % és 7±6 %) az immunpozitív sejtmagok arányát.

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink legfontosabb megállapításai a következők:

- 1) A karotisz artéria kétoldali okklúziója az újszülött malacban sem normoxiás, sem hipoxiás körülmények között nincs hatással az agykérgi véráramlásra.
- 2) Az általunk bevezetett új PA/HIE modell jól reprodukálta a súlyos humán PA metabolikus kritériumait (acidózis, hipoxia és hiperkapnia). Bár a reventiláció rendezte a malacok vérgáz- és metabolikus paramétereit, a súlyosan beszűkült agyi elektromos aktivitás és a kiterjedt idegsejtkárosodás egyértelműen jelezte a HIE kialakulását a 24 órás túlélési periódus során.
- 3) Az agykérgi intersticiális pH meghatározása rávilágított arra, hogy a PA alatt az agyban nagyon jelentős acidózis alakul ki, mely 1 pH egységgel (nagyságrenddel) meghaladja az artériás vérben mérhető acidózis mértékét. A PA-t követő reoxigenizáció alatti ventiláció fokozatosan rendezte az agykérgi pH-t aszfixia után, mely a túlélés további időtartamában nem mutatott jelentős eltéréseket a kiindulási értékekhez képest.
- 4) Az aszfixiát követő túlélés első 4 órájában adagolt 2.1% H₂ szignifikáns neuroprotektívot okozott: melyet egyrészt az agyi elektromos aktivitás nagyobb mértékű regenerációja, másrészt a kortikális és szubkortikális területek kisebb károsodása igazolt. 8-OHdG immunhisztokémiai eredményeink felvetik, hogy a H₂ neuroprotektív hatásáért modellünkben is legalább részben az oxidatív stressz mérséklése felelős.

A PA/HIE a gyermekgyógyászat egyik kiemelten kutatott területe. Ahhoz, hogy mérsékelni tudjuk a PA/HIE mortalitását és a központi idegrendszeri tünetek súlyosságát, korszerű újraélesztési protokollok, neuroprotektív beavatkozásokra és innovatív diagnosztikus eszközökre van szükség. A preklinikai kutatások állatkísérletes modelljei lehetőséget biztosítanak a HIE patomechanizmusának tanulmányozására és neuroprotektív kezelések tesztelésére is.

Az újszülött malac már az 1980-s évek óta az egyik legjobban elfogadott nagyállat modellje a humán újszülöttnék. Kezdetben kevésbé kifinomult PA malacmodellek jelentek meg az irodalomban, melyekben a PA-t akár az újszülött malac fejére rögzített maszkkal hozták létre. Napjainkban azonban a különböző oxigéntartalmú gázkeverékekkel változatos ideig folytatott hipoxiás lélegeztetés a legelterjedtebb módszer, melyet egyes kutatócsoportok a karotisz artéria kétoldali leszorításával egészítenek ki. Az érokkllúzió használatának hatását azonban az irodalomban csak egy közlemény vizsgálta, amely nem talált különbséget a neuronális károsodásban a hipoxia ill. a hipoxia+érokkllúzió csoport között. Ez az először talán meglepőnek hangzó állítás magyarázatot nyer azáltal, hogy a sertés cerebrovaszkuláris rendszerének anatómiai felépítése jelentősen különbözik a humán anatómiai érhálózatától. A sertésben a Willis-kör egy bonyolult érhálózatból ered, melyet artériás csodarecének, azaz „rete mirabile”-nek nevezünk. A rete a sinus cavernosus-ban

helyezkedik el, és ebből tevődik össze a belső karotisz artéria, mely egyike a Willis kört tápláló artériáknak. Továbbá, ezt a dús artériás arborizációt számos ér látja el, mint pl. a felszálló garatartería vagy egyéb koponyán belüli- és kívüli erek, melyek így egy gazdag anasztomózis rendszert képeznek a koponyacsont körül. Haaland és mtsai. illetve Burbridge és mtsai. érfestéses kísérletekkel részletesen leírták a sertés extrakraniális érhálózatának anasztomózis rendszerét és anatómiai vizsgálataik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy agyi iszkiémiát koponyán kívüli artéria lekötésével valószínűleg nem lehet kialakítani a sertésben. Jelen kutatási eredményeink pontosan ezt a feltételezést támasztják alá, mert legjobb tudomásunk szerint elsőként közölt eredményeink szerint a karotisz artériák kétoldali leszorítása nem okoz mérhető csökkenést az agykérgi perfúzióban újszülött malacban akár normoxiás akár hipoxiás körülmények között. Eredményeink magyarázatot adnak arra, hogy az érokklúzió miért nem befolyásolta jelentősen a HIE súlyosságát.

Tapasztalataink és előkísérleteink alapján új PA/HIE malacmodellt hoztunk létre, melynek kialakítása során ügyeltünk arra, hogy a humán újszülöttnben, ill. a sertésekben természetes körülmények között is viszonylag gyakran előforduló súlyos PA-val azonos mértékű kevert (respirációs és metabolikus) acidózist, hipoxiát és hiperkapniát hoztunk létre. A HIE kialakulását az agyi elektromos aktivitás (EEG) markáns depressziója is jelezte. A klinikumból jól ismert, hogy az Apgar pontszámok és a köldökartériából nyert vérből mért vérgáz és plazma metabolitok prediktív értéke alacsony a HIE kimenetelére vonatkoztatva. Az EEG így az egyik legfontosabb módszerévé vált a HIE kimenetének prognosztizálásában. Először 1972-ben Monod és mtsai. 270 aszfixiás újszülöttnből készített retrospektív analízise rávilágított arra, hogy a normális EEG korai (24-72h) visszatérése aszfixia után kedvező kimenettel korrelál. Azóta ezt számos klinikai kutatás alátámasztotta, így az agyi elektromos aktivitás vizsgálata PA után rutin módszerré vált a neonatológiában. Mindazonáltal, az újszülöttnből regisztrált EEG hullámok kiértékelése nehéz, ugyanis az agykérgi aktivitás folyamatosan változik a születés utáni napokban, az esetlegesen alkalmazott antiepileptikumok befolyásolják az EEG-t, és nincs nemzetközileg elfogadott állásfoglalás az EEG értékelésére neonatális HIE-ben. Így az EEG minták kiértékeléséhez számos pontozási skálát vezettek már be, melyek elsősorban az EEG hullámok amplitúdóját, az aktivitás folyamatosságát, a féltekék közötti aszimmetriát, az alvás-ébredési ciklusok meglétét, a görbestevékenység jelenlétét és egyéb specifikus minták felismerését vették alapul. Vizsgálatainkban mi ezért az EEG-t kétféleképpen, egy szubjektív pontrendszerrel és egy objektív EEG analízissel is értékeltük, mindkét módszerrel kimutatható volt a HIE kialakulása, ill. a H₂ jótékony hatása.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PA/HIE kialakulásakor az agykérgi intersticiális pH is jelentősen befolyásolja az érintett idegsejtek túlélését. Normál körülmények között az agyi intersticiális pH rendkívül finoman szabályozott, és az extracelluláris pH megváltozása erősen hat a neuronok ingerlékenységére. *In vitro* patkány hippokampális sejt kultúrában leírták, hogy míg az acidózis csökkenti az N-metil-D-aszpartát ionsatorna megnyílási valószínűségét, addig az alkalózis fokozza azt. Hasonló módon hat a pH a feszültség függő nátrium- és kalcium ionsatornákra is. Helmy és mtsai. közölték, hogy hipoxiás-hiperkapniás (9%O₂-20%CO₂) lélegeztetéssel kialakított aszfixiás stressz súlyos agykérgi acidózist okozott újszülött patkányokban,

azonban a reoxigenizáció alatt az agyi pH rendeződését követően fokozatosan alkalózis lépett fel, mely fokozta az állatok görcskészségét. Nagyállatmodellben azonban igen csekély mennyiségű adat található csak az agyi intersticiális pH alakulásáról PA/HIE alatt, ezért megfigyeléseink fontos és új információkat nyújtanak a HIE patomechanizmusáról újszülött malacban. Egyetlen közleményt találtunk, amelyben az agyi pH-t hasonló módszerrel mérték: Bender és mtsai. egy 30 perces PA után 6.26 ± 0.14 -s agykérgi intersticiális pH-t regisztráltak, mely fél pH egységgel elmaradt az általunk mért pH értékektől. Ennek oka valószínűleg az alacsonyabb $p\text{CO}_2$ szint lehetett (61 ± 1 vs. 160 ± 23 Hgmm a mi modellünkben). Ráadásul, a modell több olyan komponenst tartalmazott, amely szembemegy a jelenleg érvényes kezelési ajánlásokkal, hiszen a reoxigenizációt 100% oxigéngázzal végezték, és intravénásan bikarbonátot adtak az acidózis gyors normalizálása érdekében, mindkét beavatkozás jelen ismereteink szerint rontja a kimenetelt. Különösen fontos, hogy a korábbi közleményben az agyi pH alakulását csak 4 órás túlélési periódusban követték, míg mi az első 24 óráról szolgáltatunk információt. Adataink azt mutatják, hogy újszülött malac modellünkben az aszfixiát követő 24 órás túlélés során nem alakulnak ki a patkánymodellben észlelt alkalotikus pH eltérések, azonban a PA alatt mért súlyos acidózis fontos szerepet játszhat a HIE kifejlődésének patomechanizmusában. Az alkalózis később még kialakulhat, mely feltevésünket humán újszülöttekből származó adatok is alátámasztják. Mágneses rezonancia spektroszkópiával mérhető az agyi intracelluláris pH és annak változásai. Ezzel a technikával Hope és mtsai. azt találták, hogy PA-t követően az első 24 órában nincs jelentős agyi pH változás az újszülöttben, mely a mi eredményeinkkel is korrelál. De az azt követő napokban emelkedő pH-t mérték, mely megkésett alkalózissra utal. Robertson és mtsai. szintén észleltek agyi alkalózist PA-n átesett érett újszülöttekben a 2. héten. A neonatális agykárosodás mértéke ezekben az újszülöttekben jó korrelációt mutatott az alkalotikus pH nagyságával, mely ha hónapokon keresztül fennállt, az kedvezőtlen prognózissal járt. Érdekességként említendő, hogy Chopp és mtsai. előagyi iszkémia patkány modellben szintén tapasztaltak posztisztkémias alkalózist, mely a túlélés 24-48. órája között lépett fel. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy hipoxiás-iszkémiás inzultust követően az agyi pH változások faj- és életkorbeli sajátosságokat mutatnak, és talán a sertés HIE modell követi leginkább a humán újszülöltre jellemző dinamikát, ami jelentősen eltér a rágcsálókban tapasztaltaktól.

A H_2 egy szintelen, szagtalan, íztelen, nem mérgező gáz, melyet bőségesen elő lehet állítani víz hidrolízisével vagy egyéb kémiai reakciókkal, így szemben pl. a xenonnal könnyen megfizethető és elérhető. Bár a H_2 erősen gyúlékony O_2 -nel keveredve, de 4% H_2 koncentráció alatt nem gyúlékony. Mivel Ohsawa és mtsai. az optimális neuroprotektív koncentrációt 2%-nak találták, így biztonságosan alkalmazható klinikai körülmények között is. A legelőnyösebb tulajdonsága, hogy a kicsi molekulaméretnek és amfipatikus tulajdonságának köszönhetően könnyen oldódik vizes fázisban, és átjut a biológiai membránokon is, így a H_2 molekula könnyedén átjut a vér-agy gáton és gyorsan bejut a sejtekben lévő organellekbe is, mint pl. a sejtmagba és a mitokondriumba. Irodalmi adatokból ismert, hogy 2-4% H_2 lélegeztetése során a vérben 10-20 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció alakul ki. Altatott, lélegeztetett betegben a H_2 bejuttatása a szervezetbe legcélszerűbben a lélegeztetésre használt gázkeveréken keresztül lehetséges, vizsgálatainkban mi is ezt a módszert használtuk. Megemlítendő azonban, hogy más betegcsoportokban intravénás infúzió vagy H_2 dúsított víz fogyasztásával is

vannak próbálkozások, ill. a laktulóz fogyasztásával is jelentősen fokozható a bélflóra által termelt H₂ mennyisége. A H₂-nel dúsított fiziológias sóoldat infúziója biztonságosnak bizonyult már szélütést szenvedett felnőttek kiegészítő terápiájaként.

A tézis legfontosabb eredménye talán az, hogy a súlyos HIE-t létrehozó transzlációs nagyállatmodellben sikerült kimutatnunk a PA után megkezdett H₂ kezelés potens neuroprotektív hatását. A gáz neuroprotektív hatásának pontos molekuláris mechanizmusát még nem ismerjük. Ohsawa és mtsai. arról számoltak be, hogy a H₂ gáz szelektíven csökkenti a hidroxil- és peroxinitrit gyökök szintjét, míg más prooxidánsok szintjét (hidrogénperoxid, szuperoxid anion, nitrogén monoxid gyök) változatlanul hagyja. Azaz a H₂-nel csak a legagresszívebb oxidánsok lépnek reakcióba. Az elmúlt 10 évben számos kutatócsoport tesztelte a H₂ hatásait különböző hipoxiás/iszkémiás-reperfüziós állatmodellekben, fókuszálva a H₂ antioxidáns, gyulladásgátló és apoptózist gátló hatásaira. Mára, gyakorlatilag valamennyi olyan kutatási területen kimutatták a H₂ jótékony hatását, ahol az oxidatív károsodás fontos szerepet játszik a sejtek károsodásában. Néhány példát említve: egy szívinfarktus patkány modellben 2% H₂ belélegzése jelentősen javította a bal kamra kontrakcióját, mialatt csökkentette az elhalt terület nagyságát és az oxidatív stressz mértékét, melyet a csökkent 8-OHdG immunhisztokémiai analízissel támasztottak alá. Továbbá, a H₂-nel dúsított sóoldat adagolása szignifikánsan javította a vesefunkciókat patkány vese-iszkémia modellben, jelentősen csökkentette a gyulladással citokinek szintjét és az oxidatív károsodás mértékét is. Ez utóbbit a csökkent malondialdehid és 8-OHdG szintek igazolták. Egy retina iszkémia/reperfüziós modellben az egy héten keresztül naponta végzett H₂ belélegzés szignifikánsan kivédte a ganglionsejtek károsodását a gyulladással citokinek termelődésének csökkenésén keresztül. A H₂ gáz neuroprotektívnek bizonyult számos agyi artéria okklúzió okozta szélütés patkány modellben is: jelentősen csökkentette a malondialdehid immunhisztokémiai festődését, csökkentette a kaspáz-3 enzim aktivitását és a 8-OHdG pozitív sejtek számát az infarktus területén, végül, fokozta az antioxidáns enzimek szintjeinek emelkedését. Jelen eredményeink jól illeszkednek az irodalmi eredményekhez, a vizsgált agyterületeken a 8-OHdG immunhisztokémia kimutatta az oxidatív neuronkárosodás csökkenését a H₂-nel kezelt csoportban.

Összegzésül kijelenthetjük, hogy kutatásaink igazolták a molekuláris H₂ neuroprotektív hatását egy új középsúlyos/súlyos PA/HIE transzlációs nagyállat modellben. Ennek érdekében először kritikusán megvizsgáltuk a korábbi PA/HIE sertés állatmodellek módszertanát és transzlációs értéküket. Kimutattuk, hogy a karotisz artéria kétoldali leszorítása az újszülött malacban nem okoz agykérgi iszkiémiát. Így megkérdőjelezhetővé vált a mechanikus érleszorítás szükségessége. Sikeresen megtervezünk, és részletesen jellemeztünk egy szubakut HIE modellt, melyben az általunk alkalmazott anesztézia/analgészia, szupportív terápia és a PA módszertan fokozta modellünk transzlálhatóságát a klinikum felé. Kimutattuk, hogy az alkalmazott PA képes súlyos és jól reprodukálható agykárosodást létrehozni, melyet az agykérgi elektromos aktivitás beszűkülése is kísért. Ebben a modellben a 2.1% H₂-t tartalmazó gázkeverék terápiás szempontból releváns, azaz a PA-t követően megkezdett belélegzetése elősegítette az EEG aktivitás visszatérését, és

mérsékelte a neuronális károsodás mértékét az általunk megvizsgált valamennyi régióban. Feltételezzük, hogy a neuroprotektív hatások részben az oxidatív stressz csökkenésén keresztül valósultak meg, melyet a csökkent 8-OHdG immunjelölődés támasztott alá. Jövőbeni céljaink között szerepel a TH, ill. a H₂ és a TH együttes alkalmazásának vizsgálata, lehetséges additív neuroprotektív hatásuk feltárása.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször szeretném megköszönni Prof. Dr. Jancsó Gábornak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, aki lehetőséget biztosított a posztgraduális képzésbe való belépésemre.

Továbbá, köszönettel tartozok Prof. Dr. Sáry Gyulának, az Élettani Intézet vezetőjének, aki munkámat lehetővé tette és támogatta.

Végül, de nem utolsó sorban, Dr. Domoki Ferencnek, témavezetőmnek.

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

Domoki F, Zolei-Szenasi D, Olah O, Toth-Szuki V, Nemeth J, Hopp B, Bari F, Smausz T(2014) Comparison of cerebrocortical microvascular effects of different hypoxic-ischemic insults in piglets: a laser-speckle imaging study. *J. Physiol. Pharmacol.* 65(4): 551-8.

Nemeth J, Toth-Szuki V, Varga V, Kovacs V, Remzso G, Domoki F (2016) Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Physiol. Pharmacol.* 67(5): 677-689.