

A citotoxikus agyödéma mechanizmusai

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Zádor Zsolt

Kísérletes és klinikai idegtudomány doktori program

Témavezető: prof. Mihály András

Szeged, 2009.

Bevezetés

Az agyvizenyő - a központi idegrendszer szöveteiben történő gyors és kóros folyadékfelszaporodás - az egyik legnagyobb kihívás a neurointenzív ellátás számára. A hirtelen felhalmozódó szöveti folyadék az agy térfogatának tágulását eredményezi, amely a zárt koponyaűrön belül megemelkedett nyomáshoz vezet. A közvetlen szövetkárosító hatásán túl, a magas koponyaűri nyomás ellentétesen hat az agyi artériák nyomásával, így akadályozza az agyi perfúziót, tovább rontja a szövet túlélési esélyeit. Egyes esetekben az agyérhálózat önszabályozó folyamata is zavart szenved, így az agy vérellátása képtelen igazodni a vérnyomás ingadozáshoz, mely 1) szöveti vérbőséget előidézve tovább emelheti a koponyaűri nyomást, illetve 2) alacsony vérnyomás esetén elégtelen szöveti perfúziót okozhat.

A kialakulás sejt szintű folyamata alapján citotoxikus és vazogén ödémát különíthetünk el: az előbbi az agysejtek duzzadását jelenti, míg az utóbbi a vér-agy gát elégtelensége miatt jön létre. Bár egyik ödéma típus sem jelentkezik önállóan, mégis az egyes kórfolyamatokban az egyik típus dominál a másik felett: citotoxikus sejtduzzadás – főleg asztrocita duzzadás - figyelhető meg zárt koponyasérülés szubakut szakaszában, agyi iszkémiában míg vazogén ödéma az uralkodó a primer agytumorokban, gyulladós idegrendszeri betegségeken (meningitis, encephalitis, agytájog, tumefaktív sclerosis multiplex).

A kórfolyamatnak megfelelően az agyödéma kezelési módszerei jelenleg a következőkre korlátozódnak: koponyaűri nyomáscsökkentés a) agyvíz csapolással kamradrénen keresztül, b) hipertóniás oldatok adása a szövetvizenyő kivonására, c) dekompresszív craniotomia mely teret enged az agyszövet tágulásának, továbbá bizonyos esetekben: d) hyperventilláció,

mely a kitágult agyi ereket konstrikcíóba hozza, illetve e) steroidok adása a vér-agy gát helyreállítására. Az eddigi klinikai tapasztalat szerint ezek a módszerek sokszor elégtelennek bizonyultak a hatékonyabb kezelési lehetőségek kidolgozásához, ezért az elmúlt években az agyödéma további részfolyamatai illetve molekuláris szintű mechanizmusait vizsgálták .

Az agyödéma kialakulásában bizonyítottan fontos szerepet játszanak az úgynevezett *aquaporin (AQP) vízcsatornák*, melyek nagyban elősegítik a víz sejtmembránon keresztül történő átjutását. Az aquaporinok 4-es altípusa érdekes módon a vér-agy gátban illetve agyvíz-agyszövetet határoló asztrocita talpakban fejeződik ki, ez alapján feltételeztek, hogy fontos szerepe van az agyba illetve az agyból történő vízáramlás szabályozásában. Ennek megerősítésére az aquaporin-4 hiányos transzgenikus egerekben megfigyelték, hogy a citotoxikus agyödéma kialakulása időben elhúzódik, az asztrocita talpak duzzadása csökken és ezzel párhuzamosan jobb az állatok túlélése. Vazogén ödémában az aquaporin 4 hiánya az ödéma felszívódás elhúzódása miatt súlyosbította az agyvizenyőt és ezáltal rontotta a halálozási arányt.

Az asztrociták talpnyúlványait, illetve sejtestjeit az úgynevezett réskapcsolatok (gap junction-ok) kötik össze, ezáltal a teljes idegrendszert átjáró hálózattá kapcsolják őket össze. Ezen réskapcsolatok átjárhatóságát a connexin 43 fehérjeegységek foszforiláltsági foka határozza meg, amely szoros szabályozás alatt áll. Bár az agyödéma folyamatában eddig még nem vizsgálták a réskapcsolatok szerepét, passzív molekula áteresztő képességük miatt fontos szerepet tölthetnek be ebben a kórfolyamatban.

Célkitűzések

A citotoxikus agyvizenyőnek néhány fontos következményét az eddigi klinikai gyakorlat nem követte szoros figyelemmel. Ide tartozik 1) a sejtközi állomány összehúzódása, mely kapcsán a neurotranszmitterek, jelző molekulák, gyógyszerek és akár vírus vektorok illetve DNS-lipid komplexek mozgása akadályozott. 2) Az agyi kapillárisokat határoló asztrocita talpak duzzadása összenyomja a mikroerek lumenet, ezáltal rontja az agy mikrokeringését. Első célkitűzéseink voltak, hogy az aquaporin 4 szerepét vizsgáljuk ebben a két folyamatban transzgenikus egérmodell felhasználásával.

Az agyvizenyőben szenvedő betegek kezelésre adott válasza és ennek megfelelően a klinikai története nagyon változatos. Felmerült a kérdés hogy vajon az aquaporin 4 molekulák mutációja eredményezhet-e különbségeket az agyvizenyő kialakulásában? A választ keresve megmértük humán kohortból kiszűrt AQP4 csatorna variánsok vízáteresztő képességét szövettenyészet modellben.

Végül feltételeztük, hogy a réskapcsolatoknak szerepük lehet az asztrociták közötti vízáramlás elősegítésében, az alapján, hogy 1 kDa alatti részecskéket készséggel áteresztenek, ideértve a vizet is. Ennek felderítésére megvizsgáltuk a réskapcsolatok szerepét az epilepsziás rohamot követő asztrocita duzzadás kialakulásában.

Eredmények

Az AQP4 működés elősegíti az agyödémában megfigyelt sejtközi diffúziócsökkenést

Új mikrooptikai módszert fejlesztettünk ki a sejtközi térben történő diffúzió mérésére, mellyel az agy mélyebb struktúrai is hozzáférhetővé válnak. A módszert a citotoxikus agyödéma egyik jól kipróbált kísérletes rendszerében a vízintoxikációs modellben alkalmaztunk. A vízintoxikációt követő 10. percben a sejtközi diffúzió mintegy 12-szeresével csökken az agykéreg mélyebb rétegeiben, összhangban a korábbi agykéreg felszínén végzett mérésekkel. Az AQP4 deficiens egerek agykérgében azonban ugyanebben az időpontban nem figyeltünk meg szignifikáns diffúziócsökkenést.

Az AQP4 működés elősegíti az agyödémában megfigyelhető mikrokapilláris kompressziót. Elektronmikroszkópos felvételeken végzett méréseink szerint a fokális sérülés penumbrájában az AQP4 vízcsatornában gazdag perivaszkuláris astrocyta nyúlványok 1) korábbi citotoxikus modellben látottaknak megfelelően szignifikánsan megduzzadnak és 2) az általuk körbeölelt kapillárisokat összenyomják –“mikrovaszkuláris kompresszió”. Ezzel ellentétben az AQP4 hiányos egerekben a vad típushoz képest szignifikánsan csökkent az asztrocita duzzadás ($40 \pm 5 \mu\text{m}^2$ és $29 \pm 2 \mu\text{m}^2$ a vad illetve az AQP4 hiányos egerekben) és a kapilláris kompresszió is (kapilláris üreg terület: $13 \pm 2 \mu\text{m}^2$ versus $22 \pm 3 \mu\text{m}^2$, $n=11$, $p < 0.05$).

Az AQP4 gén egyes mutációi megváltoztatják a csatorna vízáteresztő képességét.

Az AQP4 gén gyakori (önkéntesekből álló kohortunkban 1-2%-os prevalencia) variánsait kifejező sejtvonalakat generáltunk, és a “stopped-flow” optikai eljárás segítségével megmértük a sejtekből készített szuszpenzió vízáteresztő képességét. Eredményeink szerint a I128T, D184E, I205L és M224T mutánsok relatív vízáteresztő képessége szignifikánsan kevesebb volt, rendre $48.3\% \pm 11.5\%$, $36.3\% \pm 8.1\%$, $25.6\% \pm 5.8\%$, és $31\% \pm 5.6\%$ -al a vad típusú kontrollokhoz képest ($p < 0.001$). Az M278-as variáns vízáteresztő képessége azonban $138.1 \pm 9.0\%$ -al magasabb volt a kontrollnál ($p < 0.001$). Sejtfelszíni biotinilációs vizsgálataink szerint ez utóbbi variáns felszíni kifejeződése szignifikánsan nagyobb, mint a vad típusú AQP4-é, mely megmagyarázhatja a fokozott vízáteresztő képességet (az M278-as mutáns esetén nagyobb számban volt jelen funkcióképes vízcsatorna).

A connexin 43 réskapcsolat bezáródása elősegíti citotoxikus sejt duzzadást epilepsziás rohamot követően.

Megmutattuk, hogy az epilepszia roham következtében kialakuló astrocyta duzzadással párhuzamosan a réskapcsolat connexin 43 egységeinek foszforilációs rátája csökken: 3 órával a görcs indukciót követően mintegy 50%-os foszforilációs ráta csökkenést figyeltünk meg párhuzamosan a $471\% \pm 104$ -os glia duzzadással a fiziológias sóoldattal kezelt kontrollhoz képest (100%). Ez a párhuzam 24 órával a görcskeltést követően is megfigyelhető volt, a $\sim 10\%$ -os connexin 43 foszforilációs ráta csökkenés mellett $392\% \pm 71$ -os glia duzzadás maradt fenn. Az NMDA antagonistá MK-801 előkezelés szignifikánsan csökkentette a görcsök következtében kialakult glia duzzadást

(3 óránál illetve 24 óránál rendre $292\% \pm 59$ és $129\% \pm 45$ -os glia duzzadás volt mérhető) ezzel párhuzamosan a connexin 43 egységek foszforilációs rátája a kontrollokétól nem különbözött szignifikánsan.

Diszkusszió

A jelen munka tovább szélesíti a citotoxikus agyödéma kialakulásával kapcsolatos ismereteinket. Transzgenikus egérmodell segítségével bemutatja, hogy a citotoxikus agyödéma korábban megfigyelt két következménye: az extracelluláris tér összehúzódása illetve a mikrokapillárisok összeesése az AQP4 függő citotoxikus sejtduzzadás kapcsán jön létre. Tovább vizsgálva ennek a sejtduzzadásnak a folyamatát, megmutattuk hogy az AQP4 vízcsatorna gyakori mutációi (prevalencia: $\sim 1-2\%$) megváltoztatják a csatorna vízáteresztő képességét. Ebből következtethetünk arra, hogy az ilyen mutációkat hordozó betegeknél az agyödéma klinikai lefolyása eltérő, ezáltal különféle ellátást követel. Végül megmutatjuk, hogy az epilepsziás roham kapcsán létrejövő citotoxikus agyödémával párhuzamosan az asztrociták közötti réskapcsolatok connexin 43 egységei defoszforilálódnak, mely – korábbi ismeretek szerint - a réskapcsolat bezáródását eredményezi.

A sejtközi diffúzió lassulása citotoxikus agyödémában jelentős következményekkel jár az agyszövet működésére: gátolja a neurotranszmitterek, ionok, gyógyszerek, és vektorok (vírusok, DNS-lipid komplex) diffúzióját, illetve a non-szinaptikus mechanizmusok modulálásán keresztül csökkenti a görcsküszöböt is. Az általunk kifejlesztett mikrooptikai módszerrel elsőként követhettük biológiailag releváns makromolekulák diffúzióját az agykéreg mélyebb részeiben. Az eddigi

eredményekkel összhangban közel 12-szeres diffúziólassulást figyeltünk meg 10 perccel a víz intoxikációt követően, míg az AQP4 hiányos egerekben nem volt észlelhető diffúziócsökkenés. **Eredményeink szerint citotoxikus agyödémában az agyszöveti diffúziócsökkenés az AQP4 dependens sejtduzzadás okán jön létre, ezzel tovább hangsúlyozzuk ezen vízcsatorna szerepet az agyödéma mechanizmusában.**

Citotoxikus agyödémában a mikropillárisok szintjén megfigyelhető redőződést illetve érkaliber csökkenést –“mikropilláris kompresszió”- korábbi munkák igazolták. Jelen dolgozatban elektronmikroszkópos felvételeken bemutatjuk, hogy ezek a folyamatok ugyancsak az AQP4 függő sejtduzzadás kapcsán alakulnak ki. **Az AQP4 működése a sejtközi diffúzió-csökkenés illetve a mikropilláris kompresszió elősegítésével feltehetően az agyi metabolizmus károsodásához járul hozzá citotoxikus agyödémában.**

Több klinikai tanulmány hívja fel a figyelmet a koponyasérült illetve malignus infarctust (proximális verőérszakasz elzáródást) szenvedő betegeknél látható eltérő klinikai lefolyásra, és feltételezik az AQP4 variánsainak hozzájárulását a folyamathoz. Jelen eredményeink szerint több AQP4 variáns létezik a populációban, melyek megváltoztatják a csatorna vízáteresztő képességét. **Figyelembe véve ezen variánsok jelentős, 1-2%-os gyakoriságát, nagyobb hangsúlyt kíván ezen variánsok azonosítása és, hogy a lehetséges hatásuk a betegellátás során is mérlegelésre kerüljön.** Ismert ugyanis, hogy a citotoxikus sejtduzzadást az AQP4 működést elősegítő – fokozott vízáteresztő képesség elősegíti az ödéma folyamatát - míg vazogén ödémában az AQP4 megkönnyíti az extracelluláris

vizenyő kiürítését az agyszövetből – emelkedett vízáteresztő képesség csökkenti az ödémát.

Az AQP4 működés mellett megvizsgáltuk a sejteket összekötő réskapcsolatok szerepét az asztrocita duzzadás kialakulásában. Az asztrocitákra specifikus connexin 43 az egyetlen eddig ismert réskapcsolat fehérje, mely az asztrocitákat hálózattá kapcsolja össze, tehát feltehetően fontos szerepe van sejtek közti víz- és ionátáramlás elősegítésében. Ennek a réskapcsolatnak az átjárhatósága (így vízáteresztő képessége is) a connexin 43 fehérjeegységeinek foszforilációja által szabályozódik: defoszforiláció zárja, foszforiláció nyitja a réskapcsolatot. **Eredményeink szerint a görcsfolyamat alatt kialakuló citotoxikus sejtduzzadáskor (ödémakor) a sejtközi réskapcsolatok emelkedett arányban záródnak, mely által asztrociták szigetelnek el. Így az AQP4 működés mellett a sejtközi kapcsolatok bezáródása is elősegíti a citotoxikus ödémát, mert így a szomszédos asztrocitákon sem tudják a sejtduzzadást ion/víz átvitelével kompenzálni.**

Ezek az eredmények a következő új lehetőségeket vetik fel az ödéma kezelésében: 1) az AQP4 variánsok azonosítását, 2) a réskapcsolatok működésének modulálását, 3) agyödémában kis molekula méretű gyógyszerek/vektorok használatát, 4) mesterséges oxigén hordozók fejlesztését/használatát.

A tézisek alapját képező folyóiratcikkek

I. **Zador Z**, Magzoub M, Jin S, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2008. Microfiber optic fluorescence photobleaching reveals size-dependent macromolecule diffusion in extracellular space deep in brain. *FASEB J.* 22:870-9.

II. Uchida K *, **Zador Z***, Wang V, Mihaly A, Manley GT. 2009. Aquaporin-4 deletion improves outcome by delaying the progression of cerebral edema following cortical impact. *Submitted for publication J Cereb Blood Flow Metab.*

III. Sorani MD*, **Zador Z***, Hurowitz E, Yan D, Giacomini KM, Manley GT. 2008. Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability. *Hum Mol Genet.* 17:2379-89.

IV. **Zádor Z**, Weiczner R, Mihály A. 2008. Long-lasting dephosphorylation of connexin 43 in acute seizures is regulated by NMDA receptors in the rat cerebral cortex. *Molecular Medicine Reports*, 1:721-727.

*Egyenlő mértékben közreműködő szerzők

A tézishoz kapcsolódó további folyóiratcikkek

I. Fazekas I, Szakács R, Mihály A, **Zádor Z**, Krisztin-Péva B, Juhász A, Janka Z. 2006. Alterations of seizure-induced c-fos immunolabelling and

gene expression in the rat cerebral cortex following dexamethasone treatment. *Acta Histochem.* 108:463-73.

II. Yang B, **Zador Z**, Verkman AS. 2008. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem.* 283:15280-6.

III. Jin S, **Zador Z**, Verkman AS. 2008. Random-walk model of diffusion in three dimensions in brain extracellular space: comparison with microfiberoptic photobleaching measurements. *Biophys J.* 95:1785-94.

A tézishez kapcsolódó könyvfejezetek

I. **Zador Z**, Bloch O, Yao X, Manley GT. 2007. Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog Brain Res.* 161:185-94.

II. **Zador Z**, Stiver S, Wang V, Manley GT. 2009. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol.* 190:159-70.

III. **Zador Z**, Manley GT. 2008. Role of Aquaporins in Non-synaptic Mechanisms of Epilepsy. In *Phil Schwartzkroin (Ed.), Encyclopedia of Epilepsy (in press)*. Berlin, Germany. Springer.

A tézishez kapcsolódó konferencia absztraktok

I. Mihály A, Weiczner W, Krisztin-Péva B, Dobó E, Szakács R, Czigner A, **Zádor Z**, Batoka L, Tóth G. Seizure-dependent expression of *c-fos* in the

neurons of the hippocampus (*IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, Debrecen, January 2002*)

II. **Zádor Z.:** Decrease in connexin 43 phosphorylation rate in rat model of epilepsy. (*Scientific Students` Conference, University of Szeged, February 2005, 2nd Prize, Scientific Students` National Conference, University of Szeged, March 2005, 46th Congress of Medicine and Stomatology, Kotor, Montenegro, May 2005*)

III. **Zádor Z,** Mazin Magzoub, Songwan Jin, Geoffrey T. Manley, Marios C. P apadopoulos and A.S. Verkman Microfiberoptic fluorescence photobleaching reveals enhanced macromolecule diffusion in brain extracellular space of AQP4 knockout mice. *5th International Conference of Aquaporin 2007 Nara, Japan*

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a következő személyeknek: Mihály András professzornak a Szegedi Tudományegyetem Anatómiai Intézetében az egyetemi éveim és a Ph. D. –s éveim során nyújtott irányításért. Professzor Geoffrey Manley vezető neurotraumatológusnak a témavezetésért és hogy laboratóriumában az University of California San Francisco, Department of Neurosurgery-n bevezetett egy intenzív, termékeny kutatói környezetbe. Úgy érzem, ez a lehetőség hozzájárult a kutatás terén szerzett legértékesebb tapasztalataimhoz és megerősítette érdeklődésemet az idegtudományok iránt. Munkatársaimnak, Dr. Daniel Lu-nak, Dr. Mazin Magzoub-nak, Mr, Marios Papadopoulos-nak és Dr. Xiaoming Yao-nak a a technikai segítségükért és kollegialitásukért. Barzó Pál professzornak a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Tanszékén a támogatásért és, hogy engedte távolléteimet a kutatói munka során. Michael Lawton professzornak, a vaszkuláris idegsebészet vezetőjének és Dr. Daniel Lu rezidensnek a UCSF Idegsebészeti Tanszékén a tanításaikért, inspirációjukért és hivatásbeli támogatásukért, melyek nagyban növelték érdeklődésemet és ismereteimet az operatív idegsebészet terén.

Köszönöm Dr. Bagosi Andrea segítségét az EM mérések terén, továbbá Bernard Himpens és Johan Vereecke professzoroknak (Department of Molecular Cell Biology, KU Leuven, Belgium), hogy a connexin 43 antitestet rendelkezésünkre bocsátották.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak türelmükért és támogatásukért. Sajnálom, hogy ilyen hosszú ideig távol vagyok.