

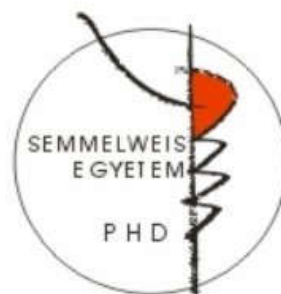
# Hipotermia a neonatális hipoxiás-izkémias encefalopátia állatmodelljeiben

**Doktori értekezés**

**Dr. Kerényi Áron**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Miklós, egyetemi docens, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Domoki Ferenc, egyetemi docens, PhD

Dr. Szigeti Krisztián, laboratórium vezető, PhD

Szigorlati Bizottság  
elnöke: Dr. Szabó András, egyetemi tanár, PhD

Szigorlati Bizottság  
tagjai: Dr. Ertl Tibor, egyetemi tanár, PhD  
Dr. Alpár Alán, egyetemi docens, PhD

Budapest

2016

## BEVEZETÉS

Az újszülöttkori hipoxiás-iszkémiás enkefalopátia (HIE) a perinatális időszak egyik legsúlyosabb betegsége. A fejlett országokban 1000 szülésből 1-2 gyermek érintett, míg a fejlődő országokban sokkal magasabb a betegség prevalenciája, amely így évente összesen 700.000 újszülött halálát okozza világszerte. Ezen felül minden évben további 1.15 millió újszülött szenved neonatális enkefalopátiában, közülük pedig kb. félmillió tartós neurológiai károsodással él tovább. Mindezek fényben egyértelmű, hogy a neonatális HIE a perinatális ellátás egyik legsúlyosabb problémája mind a mai napig.

A HIE kezelésére irányuló kutatások a 19. század óta zajlanak. Számos állatmodellt fejlesztettek ki a betegség hátterében álló patomechanizmusok és terápiás lehetőségek vizsgálata céljából. Az magzati vagy újszülött főemlős-, bány- és malac-modellek nagyban hozzájárultak a különböző agykárosodás-mintázatok feltérképezéséhez, valamint a hipoxia és az iszkémia közötti összetett kölcsönhatások megismeréséhez. A közelmúltban, a funkcionális képzőanyag fejlődésével párhuzamosan ezek a modellek a perinatális aszfixia közben zajló metabolikus folyamatok megvilágításában is fontos szerepet játszottak. Ezzel párhuzamosan számos kisállat modell is kifejlesztésre került, amelyek mind a sejtszintű- és molekuláris patomechanizmusok megismerésében, mind a potenciális terápiás intervenciók vizsgálatában központi szerepet játszottak. Annak ellenére, hogy ezeknek a modelleknek köszönhetően a HIE pathomechanizmusával kapcsolatos ismereteink robbanásszerűen fejlődtek az elmúlt 50 évben, a mai napig csak egyetlen terápiás intervenció, a hipotermiás kezelés bizonyult klinikailag is biztonságosnak és hatékonyak a neurológiai károsodás enyhítésében. Ezen felül több mint 500 neuroprotektív terápiás modalitás mutatott pozitív eredményeket a preklinikai vizsgálatokban, amelyek azonban nem váltották be a hozzájuk fűzött klinikai várakozásokat. Ez a jelentős transzlációs szakadék egyértelműen rámutat arra, hogy szükség van a meglévő preklinikai modellek felülvizsgálatára, valamint további, megbízhatóbb és relevánsabb modellek kifejlesztésére.

Valószínűleg nem túlzás azt állítani, hogy a terápiás hipotermia a közelmúlt legfontosabb eredménye a HIE-ban szenvedő újszülöttek kezelésében. Mindazonáltal a terápiás hűtés koncepciója évszázadok óta jelen van, az aszfixiás újszülöttek kezelésével kapcsolatos első feljegyzés a 17. század végéről származik. Az első hipotermiás klinikai vizsgálatok már az 1960-as években publikálták nagyon ígéretes eredményeiket. Az, hogy további 50 év volt szükséges ezeknek az eredményeknek a klinikai transzlációjához

elsősorban dogmatizmusnak és történelmi balszerencsének volt köszönhető. Mindazonáltal az elmúlt 10 év során számos randomizált klinikai vizsgálat és nagy meta-analízis támasztotta alá a terápiás hipotermia biztonságosságát és hatékonyságát, amely így mára a közép-súlyos HIE-ban szenvedő újszülöttek standard kezelésének a részévé vált. Ennek ellenére a hűtés optimális időzítése és célhőmérséklete továbbra is ismeretlen.

Bár a hipotermiára gyakran művi beavatkozásként tekintünk klinikai kontextusban, valójában evolúciós biológiai kutatások széleskörűen rámutattak, hogy a hipoxiára adott hipometabolikus és hipotermiás válasz egy evolúciósan konzervált védekező mechanizmus, amely számos faj újszülött egyedeiben megfigyelhető. Ezt a mechanizmus emberi újszülöttekben is leírták már az 1950-es években, amely akkor jelentősen hozzájárult az hipotermiás klinikai vizsgálatok megkezdéséhez. Mindez azt mutatja, hogy a terápiás hűtés sokkal inkább evolúciósan konzervált védekező mechanizmusok támogatásának tekinthető és éppen az ezt megelőző klinikai gyakorlat volt művi beavatkozás, amely során az aszfixiás újszülötteket az egészséges csecsemőknél megfigyelt hőmérsékletekre próbáltuk felmelegíteni. Ezzel párhuzamosan az is egyértelmű, hogy a preklinikai kutatások során fontos kiemelt figyelmet fordítani ennek az endogén hipotermiának a kontrollálására, hogy ez ne jelentsen zavaró tényezőt a kísérletek kivitelezésénél. Sajnos nagyon kevés olyan preklinikai vizsgálat ismert, amelyek szem előtt tartanák ezeket a szempontokat.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Ezen doktori értekezés célkitűzései a következők voltak:

- 1. Különböző célhőmérsékletek hatásának vizsgálata a HIE preklinikai malac modelljében. Ezen belül elsősorban a 30 °C-os mély hipotermia biztonságosságának és hatékonyságának elemzése klinikai kimeneteli pontok és neuro-patológiai markerek segítségével.**
- 2. Az endogén hipotermia zavaró hatásának vizsgálata hipoxia alatt és azt követően a HIE rágsáló modelljében.**
- 3. A HIE egy új, Prof Kai Kaila csoportja által kifejlesztett rágsáló modelljének karakterizálása.**

## MÓDSZEREK

### Malac kísérletek:

Minden kísérletet az Egyesült Királyság Home Office iránymutatásának megfelelően zajlott. Huszonnyolc, 24 óránál fiatalabb hím nagy fehér sertést először altatásban tracheosztómiának majd intubációnak vetettünk alá. Mindkét oldali a. carotis communis köré felfújható okklúdereket helyeztünk, valamint katéterizáltuk az a. és a v. umbilicalisokat. Minden kísérlet izoflurán anesztézia és fentanil analgészia mellett zajlott. A szívfrekvenciát (HR), az artériás középnyomást (MABP) és a rektális hőmérsékletet (Trec) folyamatos monitoroztuk, míg artériás vérgázokat 6 óránként vettünk. Az MABP-t intravénás folyadék-pótlás és inotróp kezelés segítségével tartottuk a 40 Hgmm feletti céltartományban.

A tranziens hipoxia-iszkémiás (HI) inzultust a vaszkuláris okklúderek felfújásával és a belélegzett O<sub>2</sub>-koncentráció 12%-ra csökkentésével váltottunk ki mágneses rezonancia spektroszkópiás monitorizálás mellett. A HI-t és a reszuszcitációt követően az állatokat 4 csoportba randomizáltuk: (I) normotermia (Trec 38.5 °C az egész kísérlet alatt), vagy teljes test hipotermia az inzultust követő 2-26 óra között (II) Trec 35 °C, (III) Trec 33.5 °C, or (IV) Trec 30 °C célhőmérséklettel. 26 órával az inzultust követően a hűtött csoportokat maximum 0,5 °C/óra sebességgel melegítettük vissza normotermiás hőmérsékletre. 48 órával a HI-t követően az állatok pentobarbitál eutanáziáját követően az agyakat 4% paraformaldehid (PFA) transzkardiális perfúziójával fixáltuk, majd a főbb szervekkel együtt eltávolítottuk és hisztológiai/immunhisztokémiai feldolgozásnak vetettük alá. A szérum kortizol és troponin szintek mérését, valamint a hisztopatológiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatokat a munkatársaim és a kollaborátoraink végezték. Az adatok elemzését hivatásos statisztikus végezte.

### Rágcsáló kísérletek:

Minden kísérlet az Európai Bizottság vonatkozó, 86/609/EEC számú direktívája szerint zajlott, amiket az MTA Központi Orvostudományi Kutatóintézetének Állatkísérleti Bizottsága is jóváhagyott. Időre pároztatottunk Wistar patkány párokat (Charles Rivers Laboratories, Magyarország), majd a hímeket a terhesség E19 napján eltávolítottuk a ketrecekből. A születés napján az almok méretét 8-12 állatra korlátoztuk. P7-en az újszülött állatokat az anyától különválasztva egy hőmérséklet-kontrollált ketrecbe helyeztük, amelynek egyéni cellái 37 +/- 0.5 °C-on voltak tartva (kivéve az előkísérleteket). Mindegyik aszfixiás

csoportból egy szentinel állat rektális hőmérsékletét folyamatosan monitorizáltuk, amely az egész csoport hőmérsékletének markeréül szolgált. Egy 20 perces alkalmazkodási periódust követően az állatok 15 percre kontrol vagy aszfixiás gázkeveréknek (szobalevegő vagy 4% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>, 76% N<sub>2</sub>) voltak kitéve. Ezután 60 perc normalizációt követően visszahelyeztük az állatokat az anyjuk mellé. Ennek az állatmodellnek az eredeti formáját Prof Kai Kaila csoportja fejlesztette ki a Helsinki Egyetemen. A korai kimeneteli pontokhoz randomizált állatokat 24 órával az inzultus után áldoztuk fel, míg a többi állatot felnőttkorig neveltük. Ketamin-xylazin eutanáziát követően az agyakat és a főbb szerveket eltávolítottuk, PFA-ban fixáltuk, valamint vérmintákat vettünk. Hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat Nissl festés valamint MBP, SMI-32 és IBA-1 ellenanyagok segítségével végeztünk. A felnőttkorig nevelt csoporton P40 és P100 között viselkedés-vizsgálatokat végeztünk. Ennek részeként az Open Field, az Elevated Plus Maze, valamint a Rotarod tesztekkel vizsgálatuk a neuromotor funkciókat és a szorongást, míg az Operant Learning – Delayed Discounting paradigmát használtuk a kognitív funkciók és az impulzív viselkedés elemzésére. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism V szoftver segítségével végeztük.

## **EREDMÉNYEK**

### **Különböző célhőmérsékletek vizsgálata a HIE malac modelljében**

A csoportok kiindulási paraméterei között nem volt szignifikáns különbség. Szívmegállás 6 alkalommal fordult elő a 30 °C-os csoportban és ezen állatok közül 5 elpusztult a kísérlet vége előtt. Egy állat a 33.5 °C-os csoportban szintén elszenvedett két szívmegállást, de a sikeres reszuszcitációt követően túlélte a kísérlet végéig. A többi csoportban sem szívmegállás, sem egyéb mortalitás nem fordult elő.

A szívfrekvencia szignifikánsan alacsonyabb volt a 30 °C-os csoportban a hűtés alatt a normotermiás csoporthoz képest, más eltérést azonban nem figyeltünk meg. Az MABP szintén hasonló volt a különböző csoportok között miután kiátlagoltuk a megfelelő időszakaszok szerint. Mindazonáltal a 30 °C-os csoportban számos alkalommal előfordult mély hipotenzió, amely az agresszív folyadék-pótlás és inotróp terápia ellenére gyakran szívmegálláshoz vezetett. A medián folyadék-pótlás és inotróp kezelés is szignifikánsan

magasabb volt 30 °C-os csoportban a normotermiás csoporthoz képest és szintén csak ebben a csoportban volt szükség másod- és harmadvonalbeli inotróp szerek használatára.

A pH szignifikánsan alacsonyabb volt a 30 °C-os csoportban 36 órával az inzultust követően a normotermiás csoporthoz képest. A bázis deficit szignifikánsan magasabb volt a 30 °C-os csoportban 12, 24 és 36 órával az inzultust követően az összes többi csoporthoz viszonyítva. A vércukor szintén szignifikánsan magasabb volt a 30 °C-os csoportban 12 órával az inzultust követően a normotermiás és a 35 °C-os csoporthoz képest. A legmagasabb laktát értékek szintén a 30 °C-os csoportban fordultak elő a 12 és 24 órás időpontokban, azonban ez nem volt statisztikailag szignifikáns.

A szérum kálium szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 30 °C-os csoportban 12 órával az inzultust követően a 35 °C-os és a 33.5 °C-os csoportokhoz képest. A hematokrit és hemoglobin értékek szintén magasabbak voltak a 30°C-os csoportban a hűtés alatt a többi hipotermiás csoporthoz képest. A szérum kortizol mérésekben nem találtunk szignifikáns eltérést, a kardiális troponin-I szintek azonban jelentősen alacsonyabbak voltak a 30 °C-os csoportban a többi csoporthoz képest. Makroszkópos szerv patológiai vizsgálatok nem találtak szignifikáns eltérést a csoportok között.

Az *in situ* hibridizációs kísérleteket a kollaborátoraink végezték és ezen eredmények külön kerültek publikálásra. Ezek a vizsgálatok nyolc mRNS transzkriptumra fókuszáltak, amelyek relevánsak a perinatális agykárosodás szempontjából (BDNF, MANF, GFAP, MAP2, HSP70, NgR, LDH-A, LDH-B). Az eredmények azt mutatták, hogy a legtöbb transzkriptum szintjét szignifikánsan befolyásolta a HI, ezt a hatást pedig a legtöbb agyterületen ellensúlyozta a hipotermia. Bizonyos esetekben a 33.5 °C-os hipotermia hatékonyabbnak mutatkozott, mint a 35 °C-os és a 30 °C-os hűtés. A 30 °C-os mély hipotermia egyes agyrégiókban viszont éppen tovább súlyosbította a HI hatását.

A hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat a kollégáim végezték és ezek az eredmények egy külön publikációban kerültek közlésre. Röviden összefoglalva, mind a nekrotikus és apoptotikus sejthalál, mind a mikroglialis aktiváció markerei azt mutatták, hogy a 35 °C-os és a 33.5 °C-os hipotermia egyaránt hatékonyan enyhítette a HI károsító hatását, azonban ez a protektív hatás a 30 °C-os hipotermia esetében teljesen elveszett.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a 30 °C-os mély hipotermia fokozta a mortalitást és a morbiditást HI-t követően. Ez a csoport szignifikánsan több szívmegállást és mély hiptenziót szenvedett el, miközben jelentősen több folyadék-pótlást és inotróp kezelést igényelt. Szintén ebben a csoportban fordultak elő a legsúlyosabb metabolikus zavarok is. Míg a mély hipotermia ilyen súlyos szisztémás komplikációkhoz vezetett, semmilyen

adicionális neuroprotektív hatást nem tudtunk megfigyelni, bizonyos agyrégiók esetében pedig éppen káros hatású volt.

### **Az endogén hipotermia hatásának vizsgálata a HIE rágcsáló modelljében**

Az előkísérleteink során elsőként a környezeti hőmérséklet hatását vizsgáltuk meg az állatok aszfixia-toleranciájára. Három kamrahőmérséklet-tartományt alkalmaztunk: 30-31 °C-ot, 33-34 °C-ot és 36-37 °C-ot. Azt találtuk, hogy az inzultus átlagos maximális hossza 45 perc volt 30-31 °C-on, 27.5 perc volt 33-34 °C-on és 15 perc volt 36-37 °C-on. Az intrauterin aszfixia körülményeit figyelembe véve, ahol a magzat hőmérséklete nem tud az anyai hőmérséklet alá csökkenni, a további kísérleteket mind  $37 \pm 0.5$  °C-os kamrahőmérsékleten végeztük.

Mindegyik előkísérleti csoportban a rektális hőmérséklet változásának egy hasonló dinamikáját figyeltük meg. Az inzultust megelőző akkomodációs periódus alatt az állatok egy olyan rektális hőmérséklet tartományban állapodtak meg, amelyet az adott környezeti hőmérsékleten normotermiásnak nevezhetünk. Az aszfixia alatt azonban mindegyik csoportban egy kontrollált és reprodukálható Trec csökkenést figyeltünk meg, amely végpontját a környezeti hőmérséklet által lehetővé tett legalacsonyabb hőmérséklet határozta meg. A rektális hőmérséklet-változás ezen dinamikája konzisztens volt a hipoxiás hipometabolizmussal és az endogén hipotermiával ebben a kísérleti modellben.

### **A HIE egy új rágcsáló modelljének karakterizálása**

Az előkísérletek után a következő lépésünk a HIE ezen új rágcsáló modelljének karakterizálása volt, amelyet eredetileg Prof Kai Kaila kutatócsoportja dolgozott ki a Helsinkii Egyetemen. A kiindulási paraméterek tekintetében nem volt különbség a kontrol és az aszfixiás csoport között. Az aszfixiás csoportban az összesített mortalitás 20,7 % volt, míg a kontrol csoportban nem fordult elő halálozás.

A korai agykárosodást 24 órával az inzultust követően vizsgáltuk. A Nissl festés nem mutatott jelentős neuronhalált a különböző agyrégiókban. Hasonlóképpen nem találtunk jelentős fehérállományi és axonális károsodást sem MBP illetve SMI-32 immunhisztokémia segítségével. Mindazonáltal az IBA-1 festés szignifikánsan emelkedett mikrogliális aktivációt mutatott a prefrontális kortex és a hippokampusz területén.

A felnőttkori viselkedéstanulmányokban nem találtunk különbséget lokomóció és motoros funkció tekintetében a csoportok között az Open Field, a Rotarod és az Elevated Plus Maze



tesztekben. Ezzel szemben az aszfixiás csoport jelentősen emelkedett szorongás-szerű viselkedést mutatott az Elevated Plus Maze tesztben. A Delayed Discounting tesztben a két csoportnál hasonló jutalom-tanulást figyeltünk meg, azonban az aszfixiás csoportban jelentősen emelkedett volt a motoros impulzivitás szintje.

Összefoglalva tehát 24 órával az inzultust követően megfigyeltünk egy lokális neuroinflammációt a prefrontális kortex és a hippocampusz területén, amely azonban nem járt együtt jelentős neuronhalállal vagy fehérállományi sérüléssel. Ezzel párhuzamosan felnőttkorban szintén nem volt durva neuromotoros diszfunkció, viszont szignifikánsan fokozott szorongás és motoros impulzivitás volt megfigyelhető az aszfixiás csoportban. Ez a fenotípus hasonló a humán figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (ADHD) klinikai képéhez. Epidemiológiai kohort vizsgálatok korábban már felvetették, hogy perinatális hipoxiás események közre játszhatnak az ADHD kifejlődésében. A HIE ezen új rágszáló modellje alkalmas lehet ezeknek a kapcsolatoknak, valamint potenciális neuroprotektív beavatkozásoknak a vizsgálatára.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Az ezen értekezésben leírt munka alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- 1. A 30 °C-os mély hipotermia súlyos szisztémás mellékhatások rizikójával járt, viszont nem mutatott addicionális neuroprotektív előnyt a neonatális hipoxiás-szikkémiás enkefalopátia preklinikai malac modelljében. Az eredményeink megerősítik annak fontosságát, hogy a terápiás hipotermiát adaptáló központok szigorúan kövessék a jelenlegi klinikai irányelveket és igyekezzenek a túlhűtést elkerülni.**
- 2. A hipoxiás hipometabolizmus és az endogén hipotermia jelentős zavaró tényezők a születéskori aszfixia preklinikai rágcsáló modelljeiben. A transzlációs érték maximalizálása érdekében fontos, hogy kutatók a kísérletek során külön figyelmet fordítsanak az endogén hipotermia hatásának minimalizálására.**
- 3. Az enyhe perinatális aszfixia ezen új, non-invazív rágcsáló modellje egy olyan neuropatológiai és viselkedési fenotípushoz vezet, amely konzisztens a humán ADHD klinikai képével. Ez a paradigma alkalmas lehet a perinatális behatások és a későbbi fejlődésneurológiai eltérések közötti kapcsolat megvilágítására.**

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

**A. Kerenyi**, D. Kelen, SD. Faulkner, A. Bainbridge, M. Chandrasekaran, EB. Cady, X. Golay, NJ. Robertson: *Systemic effects of whole-body cooling to 35 °C, 33.5 °C, and 30 °C in a piglet model of perinatal asphyxia: implications for therapeutic hypothermia*, Pediatric Research, 2012

L. Olson, S. Faulkner, K. Lundströmer, **A. Kerenyi**, D. Kelen, M. Chandrasekaran, U. Ádén, L. Olson, X. Golay, H. Lagercrantz, NJ. Robertson, D. Galter: *Comparison of Three Hypothermic Target Temperatures for the Treatment of Hypoxic Ischemia: mRNA Level Responses of Eight Genes in the Piglet Brain*, Translational Stroke Research, 2013

D. Alonso-Alconada, KD. Broad, A. Bainbridge, M. Chandrasekaran, SD. Faulkner, **A. Kerenyi**, J. Hassell, E. Rocha-Ferreira, M. Hristova, B. Fleiss, K. Bennett, D. Kelen, E. Cady, P. Gressens, X. Golay, NJ. Robertson: *Brain cell death is reduced with cooling by 3.5°C to 5°C but increased with cooling by 8.5°C in a piglet asphyxia model*, Stroke, 2014

*A rágcső kísérletekből származó eredmények mostanáig nem kerültek publikálásra.*