

dc_14_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

FEHÉRJEBONTÓ FOLYAMATOK DIFFÚZ AGYSÉRÜLÉSBEN: KÍSÉRLETES VIZSGÁLATOKTÓL A KLINIKAI FELHASZNÁLÁSIG

Büki András Zoltán



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
IDEGSEBÉSZETI KLINIKA
PÉCS, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1.Súlyos koponyasérülés –epidemiológiai adatok, osztályozás	4
1.2.Diffúz agysérülés- Diffúz axonkárosodás	4
1.3. Kalcium indukálta fehérjebontó folyamatok szerepe az axonkárosodásban.....	5
1.4. Mitochondriális károsodás diffúz axonkárosodásban: apoptotikus folyamatok aktiválódásának elvi alapjai	6
1.5. Prognosztikai faktorok, biomarkerek szerepe a súlyos koponyasérültek ellátásában	6
1.6. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgálatok	7
2. CÉLKITŰZÉSEK	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZER	9
3.1. Kísérleti állatok	9
3.2. Állatkísérletek: műtéti technikák, kísérletes koponyatrauma-modellek	9
3.3 Kísérletes terápiás vizsgálatok	9
3.4. Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok	10
3.5. Hisztokémia (HC): HRP-kimutatás.....	11
3.6. Az eredmények feldolgozása	11
3.7. Viselkedésvizsgálatok	12
3.8. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis Feldolgozása	12
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	13
4.1. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kórereditében I.	13
4.2. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata – Fehérjebontó folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kórereditében II. A diffúz axon- sérülés során létrejövő mitochondriális károsodás és az apoptoticus folyamatokban szerepet játszó cisztein proteáz-kaszád (caspase) következményes aktiválódásának vizsgálata.	14
4.3. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata – Diffúz agysérüléshez társuló gerincvelői axonkárosodás	16
4.4. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis feldolgozása.....	18
4.5. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása I.: fehérjebontó folyamatok gátlásának vizsgálata.	20
4.6. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása II.: a nekrotikus és apoptoticus folyamatokat gátló pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) hatásának vizsgálata.....	21
4.7. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása III.: az apoptoticus folyamatokat gátló PARP-inhibitor L-2286 hatásának elemzése szövetteni módszerekkel valamint magatartási tesztekben	22
5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉG	24
6. IRODALOM	28
7. KÖZLEMÉNYEK.....	35
Köszönetnyilvánítás	40

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	avidin-biotin komplex
AIF	apoptosis indukáló faktor
APP	amyloid precursor protein
BDHC	benzidindihydrochloride
BP	vérnyomás (blood pressure)
Ca ²⁺	kalcium
CCI	controlled cortical impact –koponyasérülési modell
CCJ	cranio-cervicális átmenet
CMSP	calpain-mediált spectrin-bontás (calpain-mediated spectrin proteolysis)
CsA	cyclosporin A
CSF	cerebrospinális folyadék (liquor)
CSpT	corticospinális pálya (corticospinal tract)
CT	computer tomográfia (képalkotás)
Cyto c	cytochrome c
DAB	diaminobenzidin
DAI	diffúz axonális károsodás (diffuse axonal injury)
EKG	elektrocardiográfia
EM	elektronmikroszkóp
F-FM	fluorescens-fénymikroszkópos kettős (-célú) jelölés
FITC	fluorescens izotiocianid jelölés
FM	fénymikroszkópos
GCS	Glasgow Kóma Skála (Glasgow Coma Scale)
GOS	Glasgow Kimeneteli Skála (Glasgow Outcome Scale)
HR	szívritmus (heart rate)
IA	impakt akcelerációs (-koponyasérülési modell)
IAT	axonális transzport-zavar (impaired axonal transport)
ICP	intrakraniális nyomás (intracranial pressure)
icv	intracerebroventrikuláris
IHC	immunhisztokémia(-i)
IR	immunreaktív
iv	intravénás
IVV	intraventricularis vérzés
KIR	központi idegrendszer
LM	lemniscus mediális
MLF	mediális hosszanti köteg (medial longitudinal fascicle)
MPT	mitochondriális permeabilitási átmenet
NF	neurofilament
NDS	normál szamár szérum (normal donkey serum)
NFC	neurofilament kompaktió (neurofilament compaction)
NGS	normál kecske szérum (normal goat serum)
NHS	normál ló szérum (normal horse serum)
NIH	National Institute of Health
PACAP	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	foszfát puffer oldat (phosphate buffered saline)
SatO ₂	artériás vérminta oxigén telítettsége (pulzus oxymetria)
SAV	subarachnoideális vérzés
sem	átlag szórása („standard error of mean”)
SBDP	spectrin degradációs termék (spectrin breakdown product)
TAI	traumás axonkárosodás (a DAI állatkísérletes megfelelője)
TSA	tyramide-jelfelerősítés (tyramide signal amplification)
VVIP	Vector VIP-festékanyag
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Súlyos koponyasérülés –epidemiológiai adatok, osztályozás

A globális fejlődés eredményeként elterjedő motorizációval emelkedik a baleset okozta agysérülés előfordulása, mely a fejlett ipari országok 40 év alatti lakossága körében a vezető halálokat képezi; a WHO szerint a kórkép 2020-ra a harmadik leggyakoribb halálokok lesz^{63,91}.

Hazai epidemiológiai vizsgálatok a súlyos koponyasérülés népegészségügyi jelentőségén túl azt is feltárták, hogy a nemzetközi adatokhoz képest közel kétszeres halálozást regisztrálhatunk^{139,25}.

A koponya-agysérülések osztályozása éppen a kórkép összetett volta miatt több szempont szerint történhet, a mellékelt, összefoglaló táblázat (*1.táblázat*) a klinikai szempontból legrelevánsabb csoportosítást teszi közzé^{14, 41}.

1. táblázat. Koponya/agysérülések felosztása^{a,b}			
<i>Típus</i>	<i>Fő kiváltó momentum</i>	<i>Fő Patológiai jellemző</i>	<i>Ok (patoanatómia)</i>
Epidurális, akut	impakt	fokális	a.meningea media szakadás
Epidurális, szubakut/krónikus (ritka)	impakt	fokális	Diploe/emissariális véna sérülése
Subdurális, akut	Gyorsulás/lassulás>impakt	fokális ^c	Hídvéna és/vagy felszíni artéria sérülése
Subdurális, szubakut/krónikus	Gyorsulás/lassulás>impakt>ismeretlen	fokális	Hídvéna sérülése
Traumás subarachnoideális vérzés	Gyorsulás/lassulás>impakt	fokális ^c	Kérgi (piális) artéria sérülése
Agyzúzódás (contusio cerebri) /coup-countercoup/	Impakt>Gyorsulás/lassulás	fokális^c	Kérgi (piális) artéria sérülése, agyszöveti laceráció
Diffúz axonkárosodás	Gyorsulás/lassulás	diffúz	Axonkárosodás
Diffúz neuron károsodás	Gyorsulás/lassulás	diffúz	Perikaryon károsodás
Agyduzzadás "Brain swelling"	Gyorsulás/lassulás	diffúz	Kevert etiológiájú, rendkívül súlyos elsődleges+másodlagos agysérülés
Hypoxiás agykárosodás	Gyorsulás/lassulás	diffúz	Kevert etiológiájú, rendkívül súlyos elsődleges+másodlagos agysérülés
Diffúz vasculáris károsodás	Gyorsulás/lassulás	diffúz	Kevert etiológiájú, rendkívül súlyos elsődleges+másodlagos agysérülés

^a Súlyos koponyasérülés: a post-resuscitációs GCS<9

^b A disszertáció szempontjából legrelevánsabb kórképek vastagon szedve

^c Gyakran társul diffúz agyszöveti károsodással

1.2. Diffúz agysérülés- Diffúz axonkárosodás

A baleseti agysérülések patobiológiai osztályozása során fokális és diffúz elváltozásokat szokás megkülönböztetni, a két forma társulhat. A diffúz agysérülés alcsoportjai (*1. táblázat*) közül klinikai és - éppen ezért - kutatási szempontból a diffúz axonális károsodás (DAI) a legnagyobb jelentőségű². A DAI típusosan accelerációs-decelerációs mehanizmussal kialakuló, a fehérállományt, azon belül is elsősorban a corpus callosumot valamint a hosszúpályák agytörzsi szakaszát érinti^{2,3,23,35,36}. A koponyatrauma hatására létrejövő axonális károsodás az agy egész állományára kiterjedve, ép axonok között elszórtan figyelhető meg; a sérülést nyíróerők hozzák létre¹. Klinikai megjelenésére a tudatzavart magyarázó térfoglaló elváltozás-, vagy metabolikus zavar nélkül fennálló comatosus tudatállapot a jellemző^{34,35}. Gennarelli szerint a DAI 50%-ban felelős a tartós tudatzavarért illetve 35%-ban a mortalitásért a nem térfoglaló jellegű agysérülésekben³⁵.

Az axonsérülés kórfolyamatának vizsgálatában áttörést hozott Povlishock és munkatársai

1983-ban közölt munkája, amely – szemben a korábban elfogadott elképzeléssel – kimutatta, hogy a DAI nem a trauma pillanatában azonnal kialakuló axonszakadást jelent, hanem a károsodott axonok többségében egy időben fokozatosan progrediáló folyamatról van szó¹²⁴ (2. ábra). Azóta ez az elmélet számos állatfajban és modellben, valamint humán szövetmintákon is igazolást nyert^{12,13,22,23,30,32,35,37,40,86,108,119-121,123,127,142,143}. Fény- és elektronmikroszkópos megfigyelések szerint a károsodott axonszakaszok a sérülést követően azonnal (<5 perc) fokális *axolemmális permeabilitási zavart* mutatnak („mechanoporáció”), melynek következtében nagy molekulású anyagokat (pl. tormaökökér-peroxidázt, vagy dextránokat) vesznek fel, amelyek az ép axolemmán keresztül az egészséges axonokba nem tudnának bejutni^{108,109,125,128,129,152} (2. ábra). Az axolemma fokális sérülését egyéb morfológiai jellemzők kísérik: *mitochondrium duzzadás*^{80,108,109}, *neurotubulus eltűnés*^{76,78,109}, *neurofilament-módosulás*^{53,54,104,109,128,129,149}, *axonális transzportzavar*^{128,129,151} mely utóbbi az előre irányuló intraaxonális transzport – egy ponton való – fokális leállításában nyilvánul meg, és az ilyen módon szállítódó sejtalkotók illetve egyéb anyagok felhalmozódásához (*organellum-akkumuláció*) és következményes *axonduzzadáshoz* vezet^{79,81,123,124}. E duzzadás idővel egyre kifejezettebb lesz, és végül az érintett axonszakasz ballon formájában lefűződik, létrehozva ezzel a kórkép korai leírásaiból ismert proximális *axonballonok*at, míg a disztális axonszakasz Waller-féle degenerációt szenved^{18,81,120,124,127}. Az axonális elváltozások kezdetétől az axonballon kialakulásáig illetve az axonszakadásig eltelt idő a vizsgált species függvényében változik; emberben tipikusan órákban, napokban mérhető^{142,143,171}, azaz kezelésre rendelkezésre álló ún. terápiás ablak jóval hosszabb, mint kísérleti állatokban.

A diffúz axonális károsodásnak mai tudásunk szerint legalább két, morfológiailag jól elkülöníthető megjelenési formája ismert: az axonduzzadás/axonballon-képződés és az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció. A klasszikus elképzelés szerint e két morfológiai jelenség kiváltásában ugyanazok a tényezők játszanak szerepet, ezáltal ugyanazokat az axonokat érintik¹⁰⁸; a legújabb nézetek szerint azonban – a legtöbb esetben – a kétféle elváltozás két jól-elkülöníthető axon-populációban figyelhető meg^{74,152}.

1.3. Kalcium indukálta fehérjebontó folyamatok szerepe az axonkárosodásban

A Ca^{2+} -dependens folyamatok közül az egyik legfontosabb a calpain aktiválódása, amelynek számos idegrendszeri kórkép így a traumás agysérülések fokális^{44,95-97,112-114,118,134} illetve diffúz^{61,62,133} típusa kialakulásában is fontos szerepe van. A calpain elsősorban a nekrotikus sejthalál kialakulásában vesz részt, de egyes apoptotikus folyamatok során is aktiválódik⁹⁴.

A Ca^{2+} aktiválta proteolysis vizsgálatára Siman és munkatársai olyan immunsavót állítottak elő (Ab38), mely a calpain által hasított alfa-spectrin alegység 150kD molekulású fragmentumát, egy stabil, más proteázok által nem képzett fehérjét ismeri fel^{132,146-148}. A spectrin az axolemma alatt található subaxolemmális hálózat vagy kortikális citoskeleton (membrán-szkeleton) alkotóeleme, amely integráns membránfehérjékhez kapcsolódik^{28,38}, részt vesz a szinaptikus vezikulák kiürítésében, továbbá a membrán szerkezeti integritásának elengedhetetlen eleme^{46,38}.

A fent említett immunsavót felhasználva- calpain-specifikus spectrin fragmentumot (SBDP) találtak károsodott perikaryonokban és nekrotikus környezetben elhelyezkedő axonokban^{8,9,55,95,134}, calpain antagonisták adásával pedig az állatok funkcionális felépülése javíthatónak tűnt^{117,137}.

Ezek a modellek kivétel nélkül súlyos agy/gerincvelő sérüléssel, kitejedt nekrotikus üreg képződésével jártak, tehát olyan folyamatokat vizsgáltak, amelyekben a Ca^{2+} jelentős mennyiségben válik szabaddá és kiterjedt membránkárosodás alakul ki. Arról, hogy a diffúz agysérülés során/diffúz agykárosodás kísérletes modelljeiben milyen szerepet játszik a Ca^{2+} -beáramlás indukálta szerkezeti fehérjebontás, a disszertáció alapjául szolgáló kísérletektől vártunk részletes információt.

1.4. Mitochondriális károsodás diffúz axonkárosodásban: apoptotikus folyamatok aktiválódásának elvi alapjai

Finomszerkezeti vizsgálatok szerint az axon-sérülés helyén már 5 perccel a trauma után ballonszerűen duzzadt, károsodott mitochondriumok szaporodnak fel, melyek megjelenése a mitochondriális permeabilitási tranzíciós (MPT) pórus kinyílását követő végzetes mitochondriális duzzadás képét idézi, azaz valószínűleg az axolemma károsodásának hatására kialakuló intraaxonális Ca^{2+} - akkumuláció következményének tekinthető^{23,108,109,126,128,129}. Az MPT-pórus "túlaktiválódása" az 1.5 kD molekulású alatti anyagok beáramlásához, következményes folyadék-akkumulálódáshoz, a mitochondrium duzzadásához, s az organellum pusztulásához vezet^{90,145,173}. Ez a fajta túlaktiválódás akkor jön létre, amikor a citoplazmatikus/axoplazmatikus Ca^{2+} -ból túlkínálat lévén a mitochondrium divalens kationokat halmoz fel, ezáltal fokozatosan felborítva a transzmembrán potenciált. Hasonlóképp a pórus kinyílását eredményezheti annak calpain által történő részleges proteolitikus emésztése^{4,39}. A pórus kinyílása hatására proapoptotikus mediátorok szabadulhatnak fel a károsodott axonokban (cytochrome c, apoptózis aktiváló faktor /APAF/, apoptózis indukáló faktor /AIF/), melyek további fehérjebontó enzimek- így a caspase enzimes család 3-mas számmal jelölt, az apoptózis folyamatában kulcsszerepet betöltő tagjának aktiválódását is maguk után vonhatják^{43,101,144,155,156,160}.

1.5. Prognosztikai faktorok, biomarkerek szerepe a súlyos koponyasérültek ellátásában

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben több mint félszáz, neuroprotektívnek tartott szer illetve eljárás klinikai kipróbálása történt meg, még a legígéretesebbek is kudarcot vallottak^{93,158}. Ennek hátterében nemcsak a terápiás modalitások nem megfelelő megválasztása, hanem a terápia hatékonyságának megítélésére alkalmazott módszerek (Glasgow kimeneteli skála, koponyaűri nyomás/perfúzió) nem kellő érzékenysége is áll¹³⁵. Sajnálatos módon ma sem rendelkezünk olyan specifikus laboratóriumi vizsgálóeljárással illetve ágy melletti, „on-line” agyvíz vagy szérum-analysist lehetővé tevő „point of care” diagnosztikai eszközzel, mely a koponyasérülés súlyosságáról/a várható kimenetelről, a másodlagos károsodások jelentkezéséről illetve a terápia hatékonyságáról azonnali információt szolgáltatna. Mindez felkeltette az érdeklődést olyan, az agysérülés kiváltotta kórfolyamatokhoz specifikusan kapcsolódó biomarkerek iránt, amelyek megfelelő végpontként köthetik össze az állatkísérletes modelleken történő alkalmazást és a klinikai kipróbálást^{10,52,116}. E célnak leginkább az egyes fehérjebontó folyamatok hatására keletkező, egy specifikus enzim-aktiválódását jelző fehérje-lebontási termékek („signature protein”) felelhetnének meg.

Spectrin és lebontási termékei. A spectrin (*vide supra*) mind a calpain-, mind a caspase-3-mediált hasítás szubsztrátja. A 145 kDa molekulatömegű a calpain, azaz a nekrotikus-, míg a 120 kDa nagyságú degradátum a caspase-3, azaz apoptotikus folyamatokra jellemző^{48,146,170}. Állatkísérletben az SBDP-liquorszint szignifikáns emelkedését észlelték 24–72 óra között, valamint korrelációt igazoltak az erőbehatás erősségével, illetve a laesio nagyságával¹¹¹.

Prognosztikai modellek. Mivel a súlyos koponyasérültek ellátására vonatkozó korszerű ellátási irányelvekben szereplő korai szedáció a GCS prognosztikai értékét erősen csökkentette, a prognosztikai vizsgálatok a CT felvételeken látható elváltozásokra irányultak. Marshall és mtsai. 1991-ben létrehoztak egy a beteg felvétele utáni első koponya CT vizsgálat elemzésén alapuló rendszert, mely a súlyos koponyasérülteket kategorizálja és a súlyos koponyasérültek várható kimenetelének megítélésére is alkalmazható^{141,166,50}.

E beosztás alapján Maas és mtsai. hívták életre az ún. Rotterdam score-t, majd Maas és Marmarou NIH támogatott kutatási programok adatbázisainak tömegét dolgozta fel,

megalkotva a sérülés kimenetelére vonatkozó legfőbb tulajdonságokat összefoglaló IMPACT-adatbázist (és on-line kimenetel- kalkulátort)^{69,72,92,161}.

1.6. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgálatok

Povlishock és munkatársai eredményei alapján¹²⁴ a DAI progressziójának megakadályozására több támadásponton is vizsgálatok kezdődtek.

A DAI- illetve általában a koponya-agysérülés kórfolyamatának összetettsége, a nekrotikus és apoptoticus enzim-kaszád egyidejű aktiválódása, a másodlagos károsodás jelensége alapján a terápiás megközelítések két útja: a több támadáspontú, kombinált kezelés illetve a kórfolyamatok szelektív blokkolásán alapuló stratégia^{93,122}. A patobiológiai folyamatok megismerését az utóbbi, míg a klinikai kezelést az előbbi szolgálhatja jobban.

A mitochondriumok funkciójának megőrzésén keresztül az axonok integritását fenntartani képes eljárások (hypothermia^{58,82,15,77}, Cyclosporin-A kezelés^{17,83,102,102,103,105}) vizsgálata segítette a mitochondriális károsodás kóroki szerepére, az apoptoticus enzimek aktiválódásának lehetőségére irányuló, a jelen disszertáció alapját képező vizsgálatokat.

A calpain gátlása. A diffúz axonkárosodás mechanizmusának ismeretében ésszerű terápiás célpont a calpain-mediált spectrin proteolysis gátlása. Contusió traumamodellben a calpain gátlásával végzett vizsgálatokban az NFC és a spectrin-degradációs termékek képződésének csökkenését figyelték meg¹¹⁷. Bár a calpain gátlása javította a trauma utáni funkcionális kimenetelt fokális agykárosodás esetén^{137,138}, e hatás mögött a laesio területén nem sikerült csökkent CMSP-t kimutatni^{138,62}, azaz az enzim gátlás jótékony hatásának valódi okát nem azonosították.

Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) alkalmazása. A DAI kórfolyamatában mind a nekrotikus mind az apoptoticus enzim-kaszád szerepet játszik, ezért azok az eljárások, melyek feltehetően mindkettőt gátolják, kiemelt figyelmet érdemelnek.

Egyes elképzelések szerint az apoptotikus folyamatok szelektív gátlása ugyanis az elektrontranszport-lánc disszociációja illetve a cytochrome c felszabadulása, azaz a mitochondriális károsodás létrejötte után már nem eredményezheti a neuron megmenekülését, csupán az apoptoticus sejthalál helyett a nekrotikus kaszád aktiválódását, tehát a két enzimatikus folyamat közti „shiftet” idézi elő⁶⁸. A PACAP a vazoaktív intestinális peptid (VIP)/szekretin/glükagon családba tartozik, melyet először a hypothalamusból izoláltak⁸⁹. *In vitro* antiapoptoticus és gyulladáscsökkentő hatását is leírták^{26,57,60,163}. *In vivo* vizsgálatok igazolták, hogy átjut a vér-agy gáton^{7,150} és egyaránt hatásos patkányban előidézett globális és fokális agyi ischaemia előtt és után adva, valamint retinális degeneráció esetében is^{5,6}.

A PARP-gátlás. A poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) DNS-javító enzim. Az (oxidatív-) stressz hatására kialakuló DNS törés indukálja aktiválódását, melynek következményeként a NAD-ról ADP-ribóz egységeket transzferál nukleáris fehérjékre. E rendkívül energia igényes folyamat halmozott stressz hatására kialakuló túlműködésével a NAD deplécióját, ATP vesztést és a sejt energia-homeosztázisának összeomlása révén sejthalált eredményezhet²⁰.

A PARP tartós gátlása mutagenezist/cancerogenezist indukálhat, ám az akut szakban hozzájárulhat az energia-háztartás rendeződéséhez, a homeosztázis fenntartásához.

Komjáti és munkatársai (2005) szerint a PARP-gátlás nemcsak a szabadgyök-indukálta nekrozist gátolja: AIF-en keresztül a PARP közvetlenül szerepel az apoptoticus folyamatok elindításában és az NF-kappaB-n keresztül inflammatorikus folyamatokat is modulál⁵⁹.

Az elmúlt években a koponyasérülés különböző modelljeiben számos PARP-inhibitor tesztelték, így a PARP-inhibitor 3-aminobenzanide-ot, mely szignifikánsan csökkentette a hideg-indukálta agysérülés-modellben kialakuló laesio kiterjedését⁴⁹. Érdekes ugyanakkor, hogy hasonlóan a calpain gátlás neuroprotektív hatásához, a PARP-inhibíció során sem sikerült eddig minden esetben feltárni a kedvező klinikai hatás patomorfológiai hátterét^{64,11}.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I. A DAI kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe I.

- 1., Calpain aktiválódásának igazolása DAI-t előidéző kísérletes neurotrauma modellben
- 2., A calpain-mediálta szerkezeti fehérje bontás tér- és időbeli alakulásának leírása
- 3., Kolokalizációs vizsgálatokkal meghatározni a calpain-mediálta szerkezeti fehérje bontás és a DAI során kialakuló további kórfolyamatok (axoplazmatikus transzport zavar, citoskeletális kompaktálódás) tér- és időbeli viszonyát
- 4., Fény-és elektronmikroszkópos kettős-jelöléses vizsgálatok egyszerűsítésére szolgáló immunhisztokémiai eljárás kidolgozása az axonkárosodás kórfolyamatainak vizsgálatára

II. A DAI kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe II.

- 5., A DAI során létrejövő mitochondriális károsodás fény- és elektronmikroszkópos bizonyítékainak feltárása
- 6., Apoptoticus folyamatokban szerepet játszó cisztein proteáz-kaszád (caspase) aktiválódásának vizsgálata DAI-t kiváltó kísérletes neurotrauma modellben
- 7., A DAI kórereditében szerepet játszó fehérjebontó folyamatok kapcsolatának tisztázása

III. A DAI kialakulásának vizsgálata – Diffúz agysérüléshez társuló gerincvelői axonkárosodás

- 8., A diffúz axonális károsodás mértéke és az azt kiváltó energia összefüggésének leírása
- 9., Az akcelerációs - decelerációs mechanizmussal kialakuló koponya/agysérüléshez társuló, távoli (gerincvelői) diffúz axonális károsodás jelenségének igazolása
- 10., A gerincvelői DAI és az azt kiváltó mechanikai energia összefüggésének vizsgálata

IV. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis feldolgozása

11. Fehérjebontó folyamatok kimutatása koponyasérültekben: alkalmazott klinikai kutatások - A diffúz agysérülés során aktiválódó fehérjebontó folyamatok azonosítása súlyos koponyasérültek agyvíz mintáinak elemzésével
12. Prognosztikai faktorok azonosítása súlyos koponya-agysérültek ellátása során

V. A DAI kísérletes terápiás befolyásolása: a fehérjebontó folyamatok gátlása

- 13., A szelektív calpain-inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális károsodást jelző immunhisztokémiai markerek vizsgálata
- 14., A szelektív calpain-inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális membrán-permeabilitási zavar gátlásának vizsgálata

VI. A DAI kísérletes terápiás befolyásolása: a nekrotikus és apoptotikus folyamatokat gátló pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) hatása

- 15., A PACAP diffúz axonkárosodást befolyásoló képességének felmérése: trauma előtt adott polypeptid hatásának elemzése, dózis-hatás-görbe felállítása
- 16., A PACAP diffúz axonkárosodást befolyásoló képességének további vizsgálata: terápiás ablak meghatározása
- 17., A PACAP axonoprotektív hatásának vizsgálata a DAI további állatkísérletes modelljén: a centrális folyadék- perkussziós modell elemzése

VII. A DAI kísérletes terápiás befolyásolása: az apoptoticus folyamatokat gátló PARP-inhibitor L-2286 hatása

- 18., A PARP inhibitor L-2286 axonális károsodásra és funkcionális kimenetelre gyakorolt hatásának elemzése DAI állatkísérletes modelljében

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez 300-405g Wistar (Charles River, Budapest) és 365-400g súlyú Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Raleigh, NC) patkányokat használtunk, az állattartás- és kísérleti felhasználás során mindvégig a Magyar Állatetikai Bizottság (MÁB, BA02/2000-26/2001) és a Virginia Commonwealth University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Protocol for Use of Vertebrate Animals in Research szabályozása és engedélye szerint jártunk el.

3.2. Állatkísérletek: műtéti technikák, kísérletes koponyatrauma-modellek¹⁶

Kisállat-narcosis. A 4 % isoflurán, 70 % N₂O and és 30 % O₂ keverék segítségével elaltatott patkányokat orotracheálisan intubáltuk, majd folyamatos altatásban tartottuk 1,5-2 % isoflurán, 70 % N₂O és 30 % O₂ keverékét alkalmazó altatógép segítségével.

Az állatok szövettani feldolgozása előtt a peritoneum üregébe juttatott natrium-pentobarbitál-túladagolással értünk el „túlaltatást”.

Az élettani paraméterek monitorozása. Minden állatkísérlet során monitoroztuk a perifériás oxigén telítettséget, a szívritmust, a rectális és a temporális izom-hőmérsékletet, miközben az állat testhőmérsékletét szenzorokkal összekapcsolt fűtőpad segítségével 37°C-on tartottuk. Szűrőpróba szerűen kiválasztott állatokon részletes keringés-légzésmonitorozást folytattunk: véres vérnyomás monitorozás és rendszeres vérgáz meghatározás történt.

Koponyatrauma modellek. Az impakt akcelerációs (IA) koponya trauma modell⁷¹ diffúzan elszórt, a koponya sérülés hatására károsodott axonok kialakulását idézi elő elsősorban a hosszúpályák agytörzsi szakaszán (tractus corticospinális (TCSp) medullaris szakasza, a decussatio pyramidorum, lemniscus mediális (LM) és a fasciculus longitudinális mediális (FLM) nyúltvelői szakasza), anélkül, hogy gócos agysérülés, burki vérzés is kialakulna. A sérülést a koponyacsontra erősített fémkorongra 2m magasságból ejtett 450g tömegű súly hozza létre.

Centrális folyadék-perkussziós koponyatrauma. Vizsgálataink során az elsősorban diffúz és kisebb mértékben gócos agykárosodást kiváltani képes centrális módozatot alkalmaztuk, 2atm nyomással (e beállítás közepesen súlyos/súlyos sérülés előidézésére alkalmas^{29,154,157}).

Tormagyökér-peroxidáz alkalmazása. A tormagyökér peroxidázt egy órával a koponyasérülés előidézését megelőzően, már altatott és Stoelting stereotaxiás készülékben rögzített koponyájú állatban stereotaxiásan az oldalkamrába injekcióztuk a permeabilitási zavar igazolására.

3.3 Kísérletes terápiás vizsgálatok

Az MDL-28170 adagolása. E sejt-permeabilis calpain-inhibitort egyszeri, farok-vénába adott 30mg/kg bólus-adagban alkalmaztuk. Oldószerként – s egyúttal a kontroll állatok kezelésére is- 1ml vivőanyagot használtunk⁷⁰.

A PACAP adagolása. Elő-kísérleteink során 125µg/kg, fiziológias sóoldatban oldott PACAP-ot adtunk bólusban, intravénásan (i.v.) (v. femorális kanülálás után), közvetlenül a koponyatrauma kiváltása előtt, míg a kontroll-csoport ugyanilyen dózisével vivőanyagot

kapott¹⁵⁰. További kísérleteinkben intracerebroventricularis (icv.) alkalmazással kerültük meg a vér-agy-gátat, 1µg, 10µg és 100µg PACAP-ot illetve vivőanyagát kapott, valamint ál-operált állatokat is alkalmazva.

Az L-2286 PARP-inhibitor adagolása. A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Kémiai Intézetében dolgozó Hideg Kálmán Professzortól kapott PARP-gátlóval a dózis-hatás görbe megállapítása után 100µg L-2286/ 5µl fiziológiás sóoldat dózissal dolgoztunk.

3.4. Immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok

Perfúziós fixálás. A kísérleti állatok agyát túlaltatásuk után l.a. transcardiális –szelektív-nyomás-vezérelt perfúziós módszerrel (90 Hgmm), fiziológiás sóoldattal (250 ml)-, majd Millonig-féle foszfát pufferban oldott 4% paraformaldehid és 0.1% glutaraldehid keverékével, illetve egyes kísérletekben Zamboni-féle fixálóval áramoltattuk át. Egy órával a perfúziót követően az agyakat eltávolítottuk és ugyanilyen összetételű oldatban, immerziós módszerrel, 16-18 órán át utófixáltuk.

Az agytörzs feldolgozása. Az agytörzset tartalmazó szövetblokkot kinyerve^{142, 159} vibratómmal agar öntvényben 30-40µm vastag sorozat-metszeteket készítettünk, „semi-serial” technikával gyűjtve.

Immunhisztokémiai jelfelerősítés –„antigene retrieval”. Vizsgálataink során mindvégig szabadon úszó (“free floating”) metszeteket használtunk, melyeket a metszést követően foszfát puffer oldatban, majd a nem-specifikus peroxidáz aktivitás elnyomására fél órán át 0.5%-os H₂O₂ oldatban mostunk. Az IHC jelfelerősítés illetve érzékenység-fokozás céljából mikrohullámú antigén-felerősítési eljárást alkalmaztunk¹⁵³.

Antisérumok jellemzése. A disszertációban ismertetendő IHC vizsgálataink során alkalmazott elsődleges (“primary”) antitesteket a 2-3. táblázat foglalja össze.

2. Táblázat. Felhasznált immunfestési protokollok: calpain-közvetített szerkezeti fehérjebontás és az axonkárosodás klasszikus markereinek elemzése

Elsődleges Antitest, Hígítás	Cél	Alkalmazás	Másodlagos Antitest, Hígítás
Ab38 (nyúl) 1:8000	Ca ²⁺ -indukálta, Calpain-mediálta spectrin proteolysis (150-kDa spectrin fragmentum)	Fény - és elektron mikroszkópia	Biotinilált (B-) Anti-nyúl, (kecske) 1:400
RMO-14 (egér) 1:500	Neurofilamentum M-alegység, “rod domain” (citoszkeletális kompaktálódás)	Fény - és elektron mikroszkópia	(B-) Anti-egér, patkány-kimerített (ló) 1:400
APP (egér) 1:100 ill. (nyúl) 1:500-3000	Béta-amyloid precursor protein felhalmozódás (axoplazmatikus transzport károsodása)	Fénymikroszkópia	(B-) Anti-egér, patkány-kimerített (ló) 1:200

Szövetteni metszetek feldolgozása, elemzése. Az antigén- jel-felerősítés fent leírt folyamatát követően a sorozatmetszetek különböző csoportjait fénymikroszkópos (FM) egyes- illetve peroxidáz alapú kettős jelölési módszerekkel elemeztük, továbbá immun-elektronmikroszkópos (EM) analysis céljából dolgoztuk fel, illetve immunfluorescens (F-FM) kettősjelölési módszereket alkalmaztunk (3. táblázat).

Speciális IHC-módszertani vizsgálataink során a tyramide-jelfelerősítés (Tyramide Signal Amplification, TSA) alkalmazásával nemcsak kettős jelöléses vizsgálatokat végeztünk,

hanem egy új, a peroxidáz alapú ICH és a TSA-alapú F-FM kombinálásán alapuló, elektronmikroszkópos vizsgálatokra konvertálható szövettani/festési eljárást is vizsgáltunk illetve kidolgoztunk^{51,162}.

3. Táblázat. Felhasznált immunfestési protokollok: calpain- és caspase-3 közvetített szerkezeti fehérjebontás és a mitochondriális károsodás markereinek elemzése

Elsődleges antiszérum	Cél-epitop	Kísérleti cél	Másodlagos antiszérum
Ab38 , nyúl1:8000	CMSP (150-kDa SBDP)	Rutin FM	Biot. Anti-Nyúl, kecske 1:400
Ab38 nyúl1:5000	CMSP (150-kDa SBDP)	Fluoresc. FM- (F-FM) kettős jelölés FITCTSA	Biot. Anti-Nyúl, kecske 1:400
Ab38 nyúl1:1000	CMSP (150-kDa SBDP)	F-FM kettős jelölés	594 Alexa- Anti-Nyúl, kecske 1:200
SBDP-120 csirke 1:3000	120-kDa SBDP, caspase-3 eredetű	Rutin FM/EM,	Biot. Anti-Csirke, kecske, 1:400
SBDP-120 csirke1:5000	120-kDa SBDP, eredetű	F-FM kettős jelölés, FITC-TSA	Biot. Anti-Csirke, kecske 1:400
Cyto c Ab egér1:2000 PharMing.	Extramitochondriális cytochrome c	Rutin FM,EM	Biot. Anti-Egér, horse 1:400
Cyto c Ab egér1:400 PharMingen	Extramitochondriális cytochrome c	Fluoresc. FM-kettős jelölés	594 Alexa- Anti-egér, kecske 1:200
P20-Ab , nyúl 1:8000 R&D Syst.	Aktivált caspase-3	F-FM-kettős jelölés	594 Alexa- Anti-Nyúl, kecske 1:200
APP egér1:200 Boehringer	β -Amyloid Precursor Protein, NH ₂ -vég	Rutin FM	Biot. Anti-Egér, horse 1:200

IHC kontrollok. A vizsgálatok során felhasznált antitestek mindegyike széles körű elemzésen esett át, melyet részben a gyártók, részben pedig a korábbi felhasználók végeztek el^{165,134,117}. Mindazonáltal, az eredmények hitelességének további biztosításához újabb vizsgálatokat is végeztünk: minden inkubálás során használtunk olyan metszeteket, melyeket az elsődleges vagy a másodlagos antitest kihagyásával kezeltünk, továbbá a TSA kihagyásával folytatott-, illetve többszörös antitest-, illetve TSA-higítós kezelések is alkalmaztunk.

3.5. Hisztokémia (HC): HRP-kimutatás

A feltételezett axolemma- károsodás miatt HRP-t felhalmozó axonszakaszok kimutatására a fent leírtak szerinti transcardiális perfúzióhoz 2% paraformaldehide és 2.5% glutaraldehide 0.1 M Millonig- pufferben képzett oldatát használtuk. A szövetekben kötött peroxidázt a kobalt-glükóz-oxidáz módszerrel tettük láthatóvá^{109,129}.

3.6. Az eredmények feldolgozása

Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika. A tárgylemezre húzott metszeteket víztelenítés és lefedése digitális kamerával felszerelt foto-mikroszkóppal elemeztük. A digitális felvételek illetve az eredmények kvantitatív feldolgozása vak módszerrel történt, a vizsgált minták eredetét illetően tájékozatlan közreműködő bevonásával. A károsodott axonok denzitás (mm²-re vonatkoztatott jelölt axon-szám) értékeinek kvantitatív összehasonlítására SPSS 7.5 for Windows szoftver alkalmazásával, Scheffe-féle posthoc többváltozós analysissal kiegészített ANOVA segítségével került sor. Az axolemma károsodás következtében HRP-t felvevő axonok hosszának és vastagságának elemzése során Student-t tesztet használtunk.

A kísérletek során több protokollt alkalmaztunk, ezek mindegyikében a vizsgált agytörzsi illetve gerincvelői területekről származó megfelelő számú metszet előre meghatározott felszínén számoltuk meg a károsodott, IHC/HC jelölt axonszakaszokat.

3.7. Viselkedésvizsgálatok

Viselkedés-vizsgálataink során az egyensúlyozás teszt a finom-motoros koordináció⁴⁵-, az emelt keresztállás teszt¹⁰⁷ a szorongás-, a porond teszt a motoros funkciók megítélésére szolgált. A teszteredmények alapján képzett csoportátlagokat a kondicionálás utáni illetve a kontrollokban mért értékkel statisztikai módszerekkel hasonlítottuk össze.

3.8. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis Feldolgozása

A Pécsi Súlyos Koponyasérült adatbázist 2002-ben alapította e disszertáció szerzője azzal a céllal, hogy a klinikai epidemiológiai kutatásokhoz illetve a betegek követéséhez használható információs bázist teremtsen és az ellátás valamint az alkalmazott protokollok auditálást szolgálja. A rendszerbe 2009. december végéig 341 súlyos koponyasérült adatai kerültek; részben klinikai információ: élettani adatok, agyi oxigén és szöveti hőmérséklet (Licox), Astrup értékek. A Regionális Kutatásügyi Bizottság illetve az US Department of Defense engedélye illetve ellenőrzése mellett rendszeres szérum és liquor-mintavétel történik (utóbbira a külső kamrai drain indikációjának felállítását követően kerülhet sor), emellett a CT-, MRI-, laboratóriumi-, és mikrobiológiai vizsgálatok eredményét is tartalmazza az adatbázis. A több éves követés során gyűjtjük a neurológiai, mozgásszervi, képalkotó vizsgálatok eredményét, a kognitív teszt-battériával illetve endokrin követéses vizsgálatokkal nyert adatokat.

Liquorminták elemzése. A klinikai vizsgálatainkba bevont betegek kezelésének és neuro-monitorozásának menete minden vonatkozásban megfelelt a klinikai rutin ellátást meghatározó protokolloknak. A betegekből az agyvíz mintát az érvényes ellátási irányelveknek megfelelő kezelésük részeként szükségessé váló beavatkozások (külső kamrai drainage, lumbális punkció) során nyertük. A liquor-mintákon calpain- és caspase-specifikus SBDP-k kimutatására Western blottot végeztünk. Az immunjelölést kemilumineszcens reagens segítségével Kodak filmekben tettük láthatóvá. Az eredményeket denzitometriás módszerrel értékeltük és t-próbával hasonlítottuk össze.

Prognosztikai vizsgálatok. Vizsgálatunkban a klinika súlyos koponyasérült adatbázisának elemzése során 99 súlyos koponyasérült (post-resuscitációs GCS 8 vagy az alatti) CT vizsgálatait és túlélési adatait vetettük egybe. Negyvenhat esetben hagyományos CT felvételek kiértékelésére volt lehetőség, 53 esetben digitális képek számítógépes analysise történt DicomWorks 1.3.5 szoftverrel. Minden esetben a kórházba kerülés utáni – súlyos koponyasérültek esetén rutinszerűen készülő – legelső CT vizsgálat felvételeit tanulmányoztuk, a Marshall-féle beosztás valamint a Rotterdam score megállapításán túl számos további, klinikai tapasztalatok szerint a koponyaűri nyomásfokozódás indirekt jeleként értelmezhető elváltozást is elemezve. Adataink statisztikai feldolgozásához egy- illetve többparaméteres logisztikus regressziót alkalmaztunk SPSS 11.5 szoftver segítségével.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kórereditében I.

i., a calpain aktiválódásának és az axonkárosodás klasszikus markereinek viszonya- illetve a spectrin-lebontás tér-és időbeli alakulásának vizsgálata.

Kísérleteinkben a Ca^{2+} beáramlás- kiváltotta CMSP IHC kimutatásán keresztül vizsgáltuk, milyen szerepet játszhat a Ca^{2+} kiváltotta strukturális proteolysis a DAI patogenezisében.

Összesen 24 patkányon alkalmaztunk IA-sérülést 15 perctől 6 óráig terjedő túlélési időekkel, egyes és többes jelölést alkalmazó peroxidáz alapú IHC-val.

E TBI modellt alkalmazva sikerült kimutatnunk a Ca^{2+} -indukálta cisztein proteáz, a calpain aktiválódását -annak spectrin-hasító tulajdonságát felhasználva- a patkány CSpT pyramidális szakaszán továbbá a ML-ben és az MLF-ben. Szemben a korábbi elképzelésekkel azt találtuk, hogy a Ca^{2+} -indukálta proteolysis aktiválódása időben elnyújtott folyamat: a sérülés utáni 15 perctől 120 percig vizsgálva az IR axonok számának fokozatos emelkedését észleltük, a 15 és 60 illetve a 30 és 120 perces értékek között szignifikáns különbséget tapasztalva. Míg a traumát követő korai időpontokban az IR axonok morfológiailag kevésbé változtak, minimális duzzadás, kezdődő vacuolizáció jellemezte csupán őket, addig a 60-120 perces időintervallumban mind több erősen duzzadt, helyenként lefűződő, megszakadó profilt találtunk; mindez jól mutatta a DAI progresszióját a CMSP-IR axonszakaszokban.

Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy 15 perccel a trauma után az IR csapadék csaknem kizárólag az axolemma alatt, a subaxolemmális kompartmentben tárolódott, s mindössze csekély elektrondenz DAB csapadék volt megfigyelhető az axoplazmában, ott is elsősorban a duzzadt mitochondriumok felszínén; 30-60 perc után fokozatosan emelkedett az axoplazmában található csapadék mennyisége, s 120 perc után rendszerint a teljes axoplazmát kitöltötte.

Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelölési technikák alkalmazásával a DAI jelenleg ismert legérzékenyebb IHC markerének, a NF oldalkar-módosulásán alapuló citoskeletális kompaktálódást ("neurofilament compaction", NFC) kimutató RMO-14 antitestnek és a CMSP markerének (Ab38) eloszlását összehasonlítva, kolokalizációjukat egyértelműen sikerült minden vizsgált időpontban igazolni, ezzel is alátámasztva, hogy a CMSP kiemelkedő szerepet játszik a DAI patogenezisében. A kolokalizációra vonatkozó adatok alátámasztották azokat az ultstrukturális, egyes jelölésű IHC-EM vizsgálatokból származó megfigyeléseinket, melyek szerint a CMSP jelenségét mutató axonszakaszokban az axonális károsodás klasszikus jeleit, azaz mitochondriális duzzadást, NFC-t, a mikrotubulusok számának csökkenését, a myelin hüvely fellazulását és periaxolemmális terek képződését találtuk. A kettősen jelölt axonszakaszokban szintén megfigyelhető volt a CMSP-IR túlélés-függő kompartmentalizációja.

Következtetések. A calpain illetve a permeabilitás változások szerepéről a bevezetőben leírtak-^{27,28,38,108,109,129}, továbbá fenti megfigyeléseink alapján az alábbi elmélet körvonalazható.

A trauma- kiváltotta axonális feszülés hatására Ca^{2+} áramlik a vongálódásnak kitétt axonszakaszba, ahol kezdetben a subaxolemmális kompartmentben indukál fehérjebontást. Mindez jól megfelel a calpain aktiválódásáról vallott jelenlegi biokémiai felfogásnak, mely szerint egy membrán-phospholipid-kapcsolt folyamatról van szó, melynek elengedhetetlen feltétele a calpain translocatioja a membránra.

Ezen Ca^{2+} -indukálta subaxolemmális fehérjebontás az integráns membránfehérjékhez ankyrinen keresztül illetve közvetlenül is kapcsolódó spectrin-váz lebontása következtében

destabilizálja az axolemmát, a Ca^{2+} beáramlása immár kiterjedt intraaxonális proteolysist indukál s így az axon károsodása visszafordíthatatlanná válhat.

A Ca^{2+} hatására aktiválódó calcineurin-okozta neurofilament oldalkar-defoszforilálódás^{104,109} és a calpain okozta proteolytikus oldalkar-módosulás együttesen a neurofilamentumok közti távolságot fenntartó ionkölsönhatások megváltozásához és ezen keresztül a neurofilamentek közti távolság csökkenéséhez, az axonális citoszkeleton kompaktálódásához vezet. Mindez jelentősen felgyorsíthatja az intraaxonális fehérjelebomlás folyamatát, hiszen a neurofilamentumok defoszforilált formában jóval érzékenyebbek fehérjebontó enzimekre^{33,42,106,136,140}.

A beáramló Ca^{2+} ugyanakkor a mikrotubulusok ion-erősség függő disszociációját előidézve közvetlenül felelős azok számának csökkenéséért.

Az axoplazma egészére kiterjedő CMSP a citoszkeleton destruálódásához, az MPT-pórus közvetlen, proteolytikus-úton történő kinyílásához és az axonális transzportfolyamatok összeomlásán keresztül organellum akkumulációhoz, az axon fokális duzzadásához és kettészakadásához vezet.

ii., Fény-és elektronmikroszkópos kettős-jelöléses vizsgálatok egyszerűsítésére szolgáló immunhisztokémiai eljárás kidolgozása az axonkárosodás kórfolyamatainak vizsgálatára.

A kutatás e fejezetének elsődleges célja a fluorescens kettősjelölési technikák EM vizsgálatokra történő konvertálására szolgáló *módszertani* újítás kidolgozása és tesztelése volt, mindazonáltal a vizsgálatok eredményei egyértelműen megerősítették a calpain-mediált fehérjebontó folyamatoknak a diffúz axonkárosodás kórereditében játszott szerepével kapcsolatos korábbi megfigyeléseinket, melyeket 4.1.i. alatt részleteztünk.

A vizsgált axonok többsége coumarin és rhodamine fluorescenciát egyaránt mutatott, jelezve az NFC és CMSP kimutatására szolgáló elsődleges antitestek kolokalizációját. Ez a kolokalizációs módszer jóval inkább felhasználó-barát volt, mint a korábbi vizsgálatainkban használt peroxidáz alapú technikák. A hagyományos IHC alkalmazáshoz képest 25-40%-ra csökkentett koncentrációjú Ab38 első antiszérumot a gyári protokollhoz képest 1/6-nyi koncentrációjú tyramide előhívó oldatban megjelenítve is kiváló jel/zaj arányú, azaz alacsony háttér-festésű immunreakciót kaptunk, mely semmi féle más emissziós spectrumba nem vetült. Ráadásul ez a kettősjelölési technika lehetővé tette annak a korábbi felismerésünknek a pontos megerősítését, hogy az RMO-14 jelölt axonok egy része nem mutat Ab38-IR-t.

Következtetések. Ultrastrukturális vizsgálataink során az egyik legfontosabb megállapítás annak felismerése volt, hogy –dacára a bonyolult inkubációs folyamatnak és a felhúzás-lefedés-leáztatás eseménysorozatának- a szövet finomszerkezeti részletei kiválóan megőrződtek, ismét feltárva az axonkárosodásra jellemző ultrastrukturális részleteket (*vide supra*).

A TSA kiváló specificitásról és szenzitivitásról tett tanúbizonyosságot, s a DAB csapadék megjelenése legalább olyan intenzív volt, mint kutatócsoportunk korábbi, más típusú peroxidáz reakción alapuló vizsgálatainál, igazolva, hogy sem a jelfelerősítés, sem a tyramide saját, minimálisan elektrondenz volta nem befolyásolta hátrányosan az EM vizsgálatot.

4.2. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kórereditében II. A diffúz axon-sérülés során létrejövő mitochondriális károsodás és az apoptoticus folyamatokban szerepet játszó cisztein proteáz-kaszád (caspase) következményes aktiválódásának vizsgálata.

Korábbi vizsgálataink eredményei^{15,19} valamint munkacsoportunknak a DAI során jelentkező mitochondriális károsodás kivédésére illetve a CsA axonoprotektív szerepére vonatkozó

megfigyelései^{17,102,103,105} felvetették, hogy a „Pandora szelencéjeként” is emlegetett mitochondriumok^{156,172} „kinyílása” azaz az MPT-pórus szabaddá válása cyto-c kiáramláshoz és következményes caspase-3-aktiválódáshoz s így a citoskeleton irreverzibilis hasításához vezethet.

Kísérleteink célja annak FM és EM IHC-val illetve fluoreszcens kettősjelölési technikával való igazolása volt, hogy a Ca^{2+} -beáramlás indukálta CMSP és a mitochondrium károsodás előidézte cyto-c kiáramlás egyazon axonszakaszokban lokalizált jelenség, mely egyúttal a caspase enzim aktiválódásával is együtt járhat.

A vizsgálatok során 25 állatot tettünk ki IA-koponyasérülésnek, 30 perctől 6 óráig terjedő túlélési idővel.

Fénymikroszkópos, kvalitatív immunhisztokémiai megfigyelések. A kísérletes koponyasérülés kiváltását követően már 15 perc elteltével az agytörzs ponto-medulláris szakaszán a CSpT és az MLF területén cyto-c-IR illetve SBDP-120-IR axonszakaszokat láttunk, bár ebben az időpontban károsodott, immunreaktív axon-profilok csak elvétve voltak megfigyelhetők. A túlélési idő növekedésével (30-360 perc) ugyanakkor már a kvalitatív vizsgálat során is észlelhető volt az IR axonszakaszok számának jelentős növekedése.

Az összes vizsgált időpontban és agytörzsi régióban a cyto-c-IR és SBDP-120-IR axonszakaszok morfológiai megjelenése rendkívül hasonlóknak bizonyult: kezdetben fokális axon duzzanat, majd a túlélési idő növekedésével vacuolizáltság, fragmentálódás jellemezte.

Fénymikroszkópos, kvantitatív immunhisztokémiai megfigyelések. Az ANOVA-elemzés igazolta a sérülés után eltelt időnek a cyto-c-IR-axon szegmensek megjelenésére gyakorolt hatását mind a CSpT ($F_{(4,20)} = 67.715$, $p < 0.001$), mind pedig az MLF ($F_{(4,20)} = 31.969$, $p < 0.001$) területén. A Scheffe-féle *post hoc* összevetés azt mutatta, hogy a cyto-c-IR axon szegmensek denzitása szignifikánsan nőtt 60 perc és 180 perc közt ($p < 0.01$) és 180 perc és 360 perc közt ($p < 0.04$) a CSpT-ben illetve 60 perc és 180 perc közt az MLF-ben ($p < 0.01$). Az ANOVA szintén igazolta a sérülés után eltelt idő és az SBDP-120-IR axonok denzitásának összefüggését a CSpT ($F_{(4,20)} = 41.986$, $p < 0.001$) illetve az MLF ($F_{(4,20)} = 19.156$, $p < 0.001$) területén. A Scheffe-féle *post hoc* összevetés alapján az SBDP-120-IR axon szegmensek denzitása szignifikánsan nőtt az MLF-ben 15 és 30 perc ($p < 0.05$) és 60 és 180 perc közt ($p < 0.01$).

Ultrastrukturális vizsgálatok. Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal azonosított cyto-c-IR illetve SBDP-120-IR axonszakaszok mindazon morfológiai jeleket mutatták, melyeket az axonkárosodás EM elemzésekor jellemzően látunk, s a korábbi bekezdésekben részleteztünk. Abban a néhány, elszórt axonban, mely a sérülést követő 15–30 percen belül cyto-c-IR-t mutatott, az elektrondenz DAB-csapadék vagy a mitochondriumok felett, vagy azok közelében helyezkedett el, gyakran elfedve a mitochondriumok finomszerkezetét. Ahol a csapadék alatt a mitochondrium szerkezete kivehető volt, ott fellazult lamellákat, duzzadást észleltünk. Ezek a károsodott illetve csapadékkal fedett mitochondriumok kizárólag azon axon szegmensekben voltak láthatók, melyek a DAI egyéb jeleit is mutatták.

A túlélési idő növekedésével (60–360 perc) is hasonló helyzetben és környezetben találtuk a cyto-c IR-t jelző DAB csapadékot, ugyanakkor az axonális károsodás e szegmentumokban már jóval súlyosabb/előrehaladottabb képet mutatott: a citoskeleton elrendeződése is megváltozott: nemcsak kompaktáció, hanem fellazultság, feloldódás, szakadozottság volt látható, illetve organellum -így többek között duzzadt mitochondriumok-akkumulálódása is megfigyelhető volt.

Az SBDP-120-IR axonokon is jól kivehetőek voltak a DAI jellemzői. A caspase aktiválódás, azaz az SBDP-120-IR -t jelző DAB csapadék az axolemma alatt és a mitochondriumok közelében volt fellelhető. A hosszabb túlélési idő e marker esetében is azzal járt, hogy jóval súlyosabb ultrastrukturális károsodás jeleit mutató axonokban detektáltuk az SBDP-120-IR-t. Ugyanakkor, paradox módon, e jelöléssel még nyilvánvalóbb volt a mitochondriumok

károsodása és akkumulációja 3-6 órával a trauma után, hisz az SBDP-120-IR kevésbé fedte a mitochondrium felszínét, mint tette azt a cyto-c-IR-t jelző DAB-csapadék.

Kettős jelölés immunfluorescens vizsgálatok. Az immunfluorescens vizsgálatok során mind az IR-axonok lokalizációja, mind megjelenése megfelelt a korábbi közlésekben leírtaknak, továbbá megerősítette kvalitatív fénymikroszkópos IHC-megfigyeléseinket.

A koponyasérülés utáni korai szakaszban (15–30 perc) a CMSP-IR dominált, alig mutatva kettős jelölést más vizsgált markerekkel. Ebben az időszakban egyenletes, bár kissé duzzadtabb axonszakaszok ábrázolódtak CMSP-IR-al főként a CSPT területén. A túlélési idő növekedésével az egyre nagyobb számban feltűnő CMSP-IR axonszakaszok mind a cyto-c, mind pedig az SBDP-120 és p20 megjelenítését szolgáló fluorescens festéket is magukban hordozták. Az SBDP-120-IR és a p20-IR együttes megjelenítése egyfajta endogén kontroll kísérletként adta meggyőző bizonyítékát annak, hogy az apoptotikus enzim kaszkád, illetve annak legvégző végrehajtója, a caspase-3 enzim az alapvetően „nekrotikus” folyamatnak megismert diffúz axonkárosodás során aktiválódhat.

Következtetések. A CMSP IHC markerének és a cyto-c felszabadulás immunfluorescens jelének egy adott axonban történő detektálása arra utal, hogy a spectrin lebontást előidéző Ca^{2+} beáramlás összefüggésben van az axon károsodáskor korábban leírt és sikeres kísérletes terápiás támadáspontként azonosított mitochondriális károsodással.

A cyto-c és SBDP-120-IR egy adott axonban történő egyidejű megjelenítése az apoptotikus enzim-aktiváció mitochondriális károsodással való összefüggésének közvetlen bizonyítékát adja. A két cisztein proteáz egy axonon belül történő aktiválódását jelző CMSP-IR- SBDP-120-IR kolokalizáció pedig arra utal, hogy az axonok egy részében mind a „nekrotikus” mind pedig az „apoptotikus” enzim kaszkád aktiválódik.

A közelmúltban közölt biokémiai vizsgálatok alapján a spectrin caspase-3 hatására definitív, irreverzibilis hasítást szenved, tehát az axonkárosodás folyamata ettől a ponttól bizonyosan visszafordíthatatlanná válik^{167,169,170}.

Az irodalmi háttér felvázolásakor már utaltunk a nekrosis illetve apoptózis neurobiológiai folyamatokban játszott szerepével kapcsolatos ellentmondásokra. Vizsgálataink ismét jelzik, hogy a két folyamat közt nehéz éles határt húzni: a sejt illetve jelen esetben axonja a külső noxa hatására azzal az effektor (enzim-) készlettel válaszol, ha úgy tetszik, az a halál-utat választja, amely rendelkezésére áll; ha a caspase enzimrendszer aktiválódásának lehetősége adott, s ez bekövetkezik, aligha beszélhetünk axonális apoptózisról, sokkal inkább az enzimrendszerek közti kommunikációról, „végzetes együttműködésről”^{167,168}.

4.3. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata – Diffúz agysérüléshez társuló gerincevelői axonkárosodás.

i., A diffúz axonális károsodás mértéke és az azt kiváltó energia összefüggésének leírása.

A DAI-ra vonatkozó korábbi vizsgálatok felvetették annak lehetőségét, hogy a klinikai tünetek (átmeneti légzésleállás, görcsroham, agytörzsi reflexek kiesése) nélküli, enyhe koponyasérülés esetén is jöhetnek létre IHC vizsgálatokkal detektálható, károsodott axonok. Előzetes kísérleteinkben e kérdést vizsgálva 36 állatot tettünk ki IA koponyasérülésnek, az állatok 1-1 harmadában a szokványos 2m helyett 50, 100, 150cm-ről alkalmazva a 450g tömegű súlyt, 30-120 perces túléléssel meghatározva az APP-IR axondenitást a CSPT-ban.

A fénymikroszkópos elemzés során már 30 perc elteltével típusos APP-IR axonszegmenseket láttunk, a károsodott, jelölt axonok száma és a rajtuk látható alaktani jegyek az eltelt idővel arányosan a sérülés progresszióját mutatták, ugyanakkor kvalitatív vizsgálataink

során nem találtunk érdemi morfológiai különbséget az eltérő nagyságú mechanikai hatás következtében APP-IR-t mutató axonszakaszok között.

Az adatok elemzése azt mutatta, hogy a diffúz axonális sérülést kiváltó tárgy tömegével arányosan nőtt az axonkárosodás mértéke és hasonló összefüggés mutatkozott a DAI kialakulása és a kiváltó noxa közt eltelt idő vonatkozásában is; a regressziós analysis során az APP-IR axonok átlagos denzitása és a túlélési idő valamint a sérülést kiváltó súly összefüggése egyaránt szignifikáns volt: a p érték 0.017-nek illetve p 0.001 adódott.

ii., Az akcelerációs - decelerációs mechanizmussal kialakuló koponya/agysérüléshez társuló, távoli (gerincvelői) diffúz axonális károsodás jelenségének igazolása.

Az agytörzsi axonkárosodáshoz társuló gerincvelői DAI kimutatására további 36 kísérleti állat esetében, az előző szakaszban leírt fokozatokkal alkalmazott IA-sérülés kiváltása után 2, 6 és 24 órával dolgoztuk fel APP és RMO-14 IHC alkalmazásával a szövetblokkokat, három anatómiai régiót elemezve: a craniospinális átmenetet, a cervico-thoracális (C-Th.) blokkot valamint a thoraco-lumbális (Th-L.) átmenet területét. A gyorsulós-lassulós koponyasérülés kiváltotta gerincvelői DAI kvalitatív FM elemzése során a károsodást a már ismert agytörzsi pálya-szakaszokon mutattuk ki, az APP jelölés elsősorban duzzadt, a nodális-paranodális régióban immunjelölt-, időnként feltöredezett, elszakadt szegmenseken, az RMO-14 jel pedig lobulált, vacuolizált, gyakran elszakadt szegmenseken volt megfigyelhető.

A craniospinális átmenet területén a CSpT tartalmazta elsősorban az IR-axonokat, míg a C-Th és a Th-L szakaszon döntően a hátsó kötél és ritkán az elülső columna.

Az axonok e szakaszokon döntően a citoskeletális károsodás markerével jelölődtek, s ezen RMO-14-IR- szakaszok az agytörzsi jelölt axonokkal teljesen megegyező alaki jegyeket mutattak, ugyanakkor, a jóval kisebb számban detektált APP-IR axonszakaszok a gerincvelőben meglepő módon elsősorban az RMO-14-IR társaikra hasonlító lobulált, vacuolizált formát vették fel.

A statisztikai elemzés azt igazolta, hogy a károsodott axonok denzitása e vizsgálat során is a sérülést kiváltó noxa súlyosságától és a sérüléstől eltelt időtől függött, megfigyelhető volt ugyanakkor az is, hogy az agytörzstől caudálisan haladva fokozatosan csökkent a DAI kialakulása.

A Th-L átmenetben enyhe sérülés (1m ejtési magasság) esetén gyakorlatilag nem találtunk immunreaktív axon szakaszt, míg súlyosabb sérülés (2m) esetén elsősorban RMO-14 IR axon-szegmensek jelölődtek.

Következtetések. Az enyhe koponyasérüléssel kapcsolatos legfrissebb klinikai illetve képalkotó vizsgálatok mind több példát adnak arra, hogy az akut szakban klinikai tüneteket nem okozó, később ugyanakkor postcommotios syndromán keresztül akár tartós egészségkárosodásra és életminőség romlásra vezető „minor koponyasérülés” esetén az agyállományban szerkezeti eltérések detektálhatók: diffúziós tenzor képalkotás (DTI) során frakcionált anizotrópia vizsgálattal illetve susceptibility waited imaging-SWI-vel DAI közvetett illetve közvetlen jelei fedezhetők fel az agyállományban^{24,98,99}.

E klinikai jelenséget modellezik a fent részletezett állatkísérletes vizsgálataink eredményei is, melyekben az IA koponyasérülést kiváltó súly és magasság csökkentésével minden nemű klinikai tünet (légzésleállás, epilepsziás rosszullét) nélkül is előidézünk –még hozzá az alkalmazott sérülés intenzitásával és az attól eltelt idővel arányos- diffúz axonális károsodást.

A koponyasérülés kísérőjelenségeként észlelt gerincvelői DAI az agytörzsi vongalódásra vezető gyors cranio-cervicális flexió (IA-modell) hatására a gerincvelő felső szakaszán érhető, ám hasonló jelenség a C-Th. átmenetben meglepő, a Th-L. területen pedig teljességgel váratlan. Magyarázata feltételezésünk szerint abban rejlik, hogy a gerincvelő a

ligamentum denticulatumoknál illetve a kilépő gyökök területén rögzített helyzetben van, tehát teljes hossza vongálódik. Ugyancsak szerepet játszhatnak a gerincvelői DAI kiváltásában azok a „folyadék-lökéshullámok”, melyek a fejtetőre eső tárgy illetve a fenti vongalódás következtében generálódnak^{85,87}.

Az igazságügyi orvos szakértői gyakorlatban a megrázott csecsemő szindróma („shaken baby syndrome”) esetében eddig érdemben nem vizsgálat spinális DAI elemzése szükségességének alátámasztásán túl munkánk a centrális gerincvelő syndroma és a spondylosis myelopathia kialakulásának keletkezésével kapcsolatban is figyelem felhívó adatokat szolgáltat. Bár újabb adatok alapján ismert, hogy a korábban haemorrhagiás nekrozissal magyarázott, idős spondylosis betegek arca esésekor hyperextensiós mechanizmussal létrejövő centrális gerincvelő laesio háttérében nem haematomyelia, hanem elsősorban axonális laesio áll^{75,88,130}, olyan modellt, mely a fenti jelenséget akár részben magyarázná, eddig nem írtak le. Feltételezzük, hogy az időskori, gerincvelőt komprimáló spondylosis peremek olyan „fulcrum”-ként szolgálhatnak, amelyen a gerincvelő megtörhet és flexió-, főként pedig extenzió-disztrakció hatására vongalódhat. Ez a jelenség akutan is létrejöhet, DAI-t okozva (centrális gerincvelő syndroma) de krónikus fennállása is fokozatos, kiterjedt axonkárosodást eredményezhet (spondylosis myelopathia).

4.4. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis feldolgoása.

i. Fehérjebontó folyamatok kimutatása koponyasérültekben: alkalmazott klinikai kutatások - A diffúz agysérülés során aktiválódó fehérjebontó folyamatok azonosítása súlyos koponyasérültek agyvíz mintáinak elemzésével.

Alapkutatási eredményeink alapján reméltük, hogy a calpain és caspase-mediált fehérjebontó folyamatok aktiválódása során a klasszikus biomarker követelményeinek megfelelő termékek keletkeznek, melyek megjelenítésére kezdtünk szervezett liquorminta gyűjtést a PTE ÁOK Idegsebészeti Klinikán.

A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbank elemzését elővizsgálatokkal kezdtük, melyek során súlyos koponyasérültek és kontroll betegcsoport liquormintáit Western blot („dot-blot”) módszerrel hasonlítottuk össze.

Megállapítottuk, hogy a 280kD mólsúlyú intakt, és a 120kD mólsúlyú caspase-specifikus spectrin-degradációs termék a koponyatraumát szenvedettek liquorában szignifikánsan nagyobb hányadban volt jelen, mint más, koponyaúri nyomásfokozódás miatt kezelt betegek esetén. A diagnosztikus lumbál-punkción átesett betegek CSF-mintái nem tartalmaztak a vizsgálati módszereinkkel kimutatható mennyiségű SBDP-t.

Az intakt spectrin, valamint a 150- és a 120kD nagyságú SBDP-k liquor-szintjét szignifikánsan magasabbnak találtuk koponyatrauma esetén, mint a vizsgált nem-traumás, ICP-emelkedéssel járó agysérülésekben. A vizsgált fehérjék liquor-szintjében a trauma utáni 2-3. napon tetőzést találtunk, majd az ismét visszatért a kiindulási szintre.

A spectrin-szintek és a klinikai paraméterek összehasonlítása során sem a súlyossági fokkal (GCS alapján), sem a kimenetellel (GOS alapján), sem pedig az ICP-emelkedés mértékével nem találtunk szignifikáns összefüggést, ugyanakkor, főként a felvételi GCS és az intakt spectrin agyvízben történő megjelenésének viszonya – még a vizsgálatba bevont betegek kis száma ellenére is-közel szignifikáns (negatív) korrelációt mutatott ($r^2=0.318$ $P=0,07$).

Következtetések. A klinikai minták feldolgoása igazolta azt az elképzelésünket, hogy a súlyos koponyasérültekben ugyanazon fehérjebontó kórfolyamatok tetten érhetők, mint a koponyatrauma állatkísérletes modelljeiben. Eredményeinket egy potenciális biomarker kifejllesztésének szemszögéből vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a fehérje lebontási termékek

megjelenése az agyvízben jól kimutatható, és nem magyarázható csupán az emelkedett intracraniális nyomással vagy a külső kamrai drain behelyezésével.

A vizsgált fehérjék liquor-szintjének jellegzetes idő-összefüggése, valamint a már kisszámú betegen végzett Western blot vizsgálatok alapján is a sérülés súlyosságával (GCS) és a kimenetellel (GOS) összefüggő trend alapján joggal feltételezhető, hogy a calpain- és caspase-specifikus SBDP-k a jövőben hasznos patomechanizmus-specifikus biomarkerként szolgálhatnak a koponyatraumát szenvedett betegek állapotának nyomon követésében. E kijelentést időközben mind állatkísérletes, mind klinikai (elő-) vizsgálatok^{21,84,110,115,131} is alátámasztották.

ii. Prognosztikai faktorok azonosítása súlyos koponya-agysérültek ellátása során.

E vizsgálatok egyik fő célkitűzése annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy milyen prediktív modellt tudunk alkotni a sérült felvételek rendelkezésünkre álló adatok alapján; az ilyen modellek nemcsak a várható kimenetel becslése, hanem az ellátás auditálása szempontjából is kiemelkedő jelentőségűek.

A prognosztikai faktorok elemzése, más közt nemzetközi adatokkal való összevetése mellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy a hagyományos CT- „filmmel” szemben a –kizárólagos bevezetések nagy szakmai ellenállást kiváltó- digitális felvételek elemzése biztosíthat-e előnyt a kimenetel előrejelzésében.

Az elemzés során 99 súlyos koponyasérült (post-resuscitációs GCS 8 vagy az alatti) CT vizsgálatait, meghatározott klinikai paramétereit és túlélési adatait vetettük egybe a Marshall-féle beosztás valamint a Rotterdam score alapján számolt értékekkel.

Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a digitális képelemzés során értékelt paraméterek összességében szignifikánsan jobb összefüggést mutatnak a kimenetellel, mint a film-alapú képelemzés ($p=0.009$ szemben $p=0.106$). A Rotterdam score elemei közül mind a kamrába tört vérzés, mind a traumás subarachnoideális vérzés, mind pedig a ciszternák eltűnése szoros összefüggést mutatott a kimenetellel, ugyanakkor ezek külön-külön pontosabb prognosztikai értéket adtak, mint összegzett Rotterdam score-ként használva.

A Nagelkerke r^2 elemzés azt is igazolta, hogy a számítógépes képelemzéssel nyerhető további információkkal valamint az életkorral kiegészített Rotterdam score adja a legpontosabb prognosztikai eredményt.

Következtetések. Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy mind a Rotterdam score, mind a Marshall-féle beosztás kellően nagy prediktív erővel rendelkezik súlyos koponyasérülések esetén, ezért ez irányú használatuk a magyarországi betegellátásban is indokolt volna. Vizsgálatainkból kiderül, hogy súlyos koponyasérülések esetén megfontolandó lehet egyéb, a CT felvételekről megállapítható paraméterek beépítése az osztályzási rendszerekbe, mint a generalizált oedema, impressiós törés, plexus choroideus/corpus pineale aszimmetria.

Elsősorban többváltozós elemzéseink alapján válik egyértelművé, hogy a CT felvételek számítógépes szoftverrel végzett analysisével gyűjtött adatok alapján képzett prognosztikai csoportosítások prediktív értéke messze meghaladja a hagyományos CT képek elemzésének értékét. Megállapítható, hogy bár a Marshall-féle beosztás és a Rotterdam score prediktív értéke önmagában is magas, ha igazán hatékony becslést akarunk adni a sérült klinikai kimenetelére vonatkozólag, akkor nem tekinthetünk el - az azt alapjaiban meghatározó - individuális tényezőktől, mint pl. az életkor, alvadási viszonyok.

A hazai katasztrofális koponyasérült-halálozáson kizárólag akkor változtathatunk, ha sikerül a súlyos koponyasérültek ellátásában a tudományos bizonyítékon alapuló irányelveket érvényre juttatni, illetve, ha az ellátás auditálásának rendszere elterjed. A koponyasérült adatbázisok prognosztikai faktorokon alapuló elemzése, a várható kimeneteltől való eltérés

feltárása és okainak azonosítása nemcsak az ellátást finanszírozó biztosító, hanem az ellátó (és ellátott) alapvető érdeke és feladata is kell, hogy legyen.

4.5. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása I.: fehérjebontó folyamatok gátlásának vizsgálata.

i., A szelektív calpain- inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális károsodást jelző immunhisztokémiai markerek vizsgálata.

A calpain-mediált spectrin proteolysisnek a DAI kórereditében betöltött meghatározó szerepére vonatkozó korábban részletezett vizsgálatok alapján joggal vetődött fel a kérdés, képes-e a calpain aktiválódását gátló sejt permeabilis peptidil-aldehyd, az MDL-28170 megakadályozni a DAI kialakulását.

Az IA koponyatrauma modellben a sérülés előtt 30 perccel MDL-28170-t, vagy vivőanyagot farok vénán keresztül bolus-adagolásban kapott, trauma után két órával leölt patkányok agytörzsi metszeteit feldolgozva, az APP-IR és az RMO-14-IR axon-profilok morfológiai jellemzőiben nem volt megfigyelhető különbség a kezelt illetve a kontroll állatokban. A kvantitatív analysis szerint az MDL-28170 kezelés szignifikánsan csökkentette mindkét IR axoncsoport denzitását minden vizsgált agytörzsi régióban.

ii., A szelektív calpain- inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális membrán-permeabilitási zavar gátlásának vizsgálata.

A fenti eredmények alapján, a calpainnak a membrán permeabilitási zavar kialakulásában játszott szerepére vonatkozó bizonyítékokat is kívántunk szolgáltatni.

Az MDL-28170-el illetve vivőanyagával 30 perccel az IA koponyasérülés kiváltását megelőzően farok vénán át bolus injekcióban kezelt, a trauma előtt tormaagyökér peroxidázt icv kapott patkányok agytörzsi metszeteinek hisztokémiai feldolgozása során megállapítottuk, hogy az axon ép membrán-rendszerén át nem jutó tormaagyökér-peroxidáz molekulák a sérülést követően mind a CSpT mind pedig a MLF területén számos axonba bekerültek.

A kvalitatív vizsgálattal valószínűsíthető volt, hogy a gyógyszeresen kezelt állatok esetében jóval rövidebb axonszakaszok jelölődtek a CSpT területén, mint a vivőanyaggal kezelt esetében. Bár a jelölt axonok alaki megjelenésében számottevő egyéb különbség nem volt, a vivőanyaggal kezelt gyakrabban tűntek hólyagosnak „vacuolizáltak”, ami korábbi vizsgálataink során a proteolytikus folyamatok előrehaladott voltára utalt. Az is nyilvánvaló volt, hogy az MLF területén vastagabb axonszakaszok jelölődtek, mint a CSpT-ben. A digitális adatelemzés és statisztikai feldolgozás igazolta, hogy a tormaagyökér-peroxidázt halmozó jelölt axonszakaszok hossza szignifikánsan rövidebb a gyógyszeresen kezelt állatokban a CSpT-ben, ugyanakkor érdemi változást az MLF területén nem mutat. Bár a vivőanyaggal kezelt állatokban mindenütt vastagabbnak adódott a tormaagyökér-peroxidáz jelölt rostok átmérője, e különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket.

Következtetések. A calpain- gátlásnak az NFC kialakulására kifejtett jótékony hatása magyarázható a CMSP és az NFC ismert kapcsolatával. Bár a legújabb kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az NFC és az IAT részben különböző axon-populációkat érint ^{73, 152}, a calpain-gátlásnak az IAT-ra kifejtett pozitív hatása azt bizonyítja, hogy – ha a kompakció nem is társul transzport-zavarral – a calpain aktiválódása mindkét folyamatban szerepet játszik.

A trauma előtt adott calpain inhibitor az axolemmális permeabilitási zavar másodlagos (elgondolásunk szerint döntően CMSP-vel magyarázható) generalizálódását, azaz a permeabilitási zavar által érintett axonszakasz hossz-növekedését gátolta. Azt, hogy ez a gátló hatás az MLF területén miért nem volt mérhető, nem tudjuk egyértelműen megmagyarázni; feltételezésünk szerint a vastag axonokon kialakult pórusok mérete alapján már eleve olyan

mennyiségű HRP áramlott az axon-cylinderbe, mely meggátolta az érdelemi változás detektálását illetve az sem zárható ki, hogy a vastagabb tengelyfonatokban az MLF területén lassabban generalizálódott a permeabilitási zavart is fokozó calpain mediált fehérjebontás.

4.6. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása II.: a nekrotikus és apoptoticus folyamatokat gátló pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) hatásának vizsgálata.

i., A PACAP diffúz axonális károsodást befolyásoló képességének felmérése: trauma előtt adott polypeptide hatásának elemzése, dózis-hatás-görbe felállítása.

A PACAP axonoprotektív hatását megítélni hivatott vizsgálataink első fázisában azt elemeztük, hogy az IA készülékkel kiváltott koponyatrauma előtt PACAP-ot az ischaemiás agykárosodásban hatékony úton- (intravénásan), és adagban kapott patkányokban 2 illetve 6 órával a koponyatrauma után sikerül-e a károsodott, APP-IR axonok denzitását csökkenteni a CSpT és az MLF területén. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy intravénás adagolás esetén – más KIR betegségeken hatásosnak bizonyult dózisban – a PACAP sem a CSpT sem pedig az MLF területén nem csökkentette szignifikánsan az APP-IR axonok denzitását.

Annak megítélésére, hogy a PACAP hatástalanságának háttérében a vér-agy-gát nem megfelelő áthatolása, a nem megfelelő agyi eloszlás, avagy a szer eleve hatástalan volta áll-e további vizsgálatainkban a PACAP-ot stereotaxiás módszerrel az agykamrába juttattuk s egyúttal a hatásos dózis megállapítása céljából 1µg, 10µg és 100µg PACAP-ot alkalmaztunk (dózis-hatás-görbe felállítása); a szövettani feldolgozásig a túlélési idő 2 óra volt.

E kísérletben a PACAP icv 100µg-os dózisa csökkentette szignifikánsan a CSpT területén talált APP-IR axonszakaszok előfordulását.

ii., A PACAP diffúz axonális károsodást befolyásoló képességének további vizsgálata: a terápiás ablak meghatározása.

A PACAP axonkárosodást gátló hatására vonatkozó dózis-hatás görbéjének felállítása után a traumát követően késleltetve, icv-adott PACAP hatékonyságának tesztelésével a PACAP axonoprotektív hatására vonatkozó terápiás ablakot kívántuk meghatározni. A Marmarou-féle készülékkel kiváltott IA koponyatrauma után 30 perccel illetve 1 órával 100µg icv beadott PACAP- vagy vivőanyag-kezelésben részesült patkányokban a traumát követően 2 órával határoztuk meg az APP-IR illetve az RMO-14-IR axonok denzitását a CSpT-ben és az MLF-ben. Vizsgálatunkban a PACAP a fenti adagolásban mind 30 perccel, mind pedig 1 órával a koponyatrauma kiváltása után szignifikánsan csökkentette a CSpT területén az APP-IR axonok denzitását, nem volt azonban hatással az APP-IR axonok denzitására az MLF területén, illetve az RMO-14-IR axonok denzitására egyik vizsgált agytörzsi területen sem.

iii., A PACAP axonoprotektív hatásának vizsgálata a diffúz axonális károsodás további állatkísérletes modelljén: a centrális folyadék perkussziós modell elemzése.

Miközben fenti vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP icv alkalmazása jelentős mértékben csökkentette az IA koponyasérülés hatására kialakult axonális károsodást, szükségesnek láttuk, hogy az eredményeket a DAI más modelljében is megerősítsük; így esett a választás a döntően diffúz agysérülést okozó centrális folyadék perkussziós modell alkalmazására.

Az agytörzsből rendszerezetten gyűjtött vibratom-metszetek kvalitatív vizsgálata során az APP és RMO-14 IR axon-szegmentumok megjelenésében a korábbi megfigyelésekhez képest ezúttal sem tapasztaltunk eltérést. A 100µg PACAP-ot 30 perccel a sérülést követően icv-an kapott állatok esetében a digitális képelemzés és az eredmények statisztikai feldolgozása azt mutatta, hogy a CSpT-ben az APP- és RMO-14-IR axonok denzitása

szignifikánsan csökkent, míg az MLF területén a változás egyik marker esetében sem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket.

Következtetések. Előzetes feltételezésünket, miszerint a PACAP, mely az apoptotikus és a gyulladásos mediátorok gátlása, illetve bizonyos mitochondriális enzimek befolyásolása révén fejthet ki neuroprotektív hatást, azaz elvben mindkét, a DAI-ban aktívan résztvevő kórfolyamatot kedvezően befolyásolhatja -legalábbis részben- sikerült igazolnunk^{66,164}. Kezdeti vizsgálatainkban, az iv adagolás sikertelensége abban keresendő, hogy a vér-agy gáton átjutó PACAP transzportjának mértéke az agytörzsben sokkal alacsonyabb, mint más agyterületeken¹⁰⁰.

További kísérleteinkben sikerült a PACAP DAI-t gátló adagolását meghatározni és igazolnunk, hogy a diffúz agysérülés modelljében kiváltott DAI progressziójának PACAP-kezeléssel való részleges gátlására jelentős nagyságú terápiás ablak áll rendelkezésre, ami a klinikai alkalmazhatóság alapfeltétele. Ha figyelembe vesszük DAI kinetikájában egyes spécieszek között megfigyelhető, korábban említett különbséget^{142,143,171}, eredményeink klinikai relevanciája még szembeütőbb.

A vizsgálatok egy részében a PACAP NFC-ra gyakorolt jótékony hatásának elmaradása (RMO-14-IR) megerősíti azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint az IAT és az NFC részben különböző axon-populációkat érint^{73,152}, és kialakulásukban részben különböző mechanizmusok játszanak szerepet. Az IAT-ra gyakorolt PACAP-hatás elmaradása (APP-IR) az MLF területén valószínűleg annak tudható be, hogy az MLF-ben a statisztikai szignifikanciát negatívan befolyásolja a jóval kisebb sérült axon-szám, illetve az MLF területén a traumát követően 2 órával az NFC-t mutató károsodott axon-profilok dominálnak.

4.7. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása III.: az apoptoticus folyamatokat gátló PARP-inhibitor L-2286 hatásának elemzése szövettani módszerekkel valamint magatartási tesztekben.

Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a DAI kialakulásában az axonban található mitochondriumok károsodásának kulcs szerepe lehet, s azt is bizonyítottuk, hogy a mitochondriumok szerkezeti épségének megőrzésével illetve a lokális energia-homeosztázis más módon (terápiás hypothermia) történő fenntartásával a diffúz axonkárosodás mértéke csökkenthető.

A számos kísérleti modellben bizonyítottan hatékony, az axonális energia-homeosztázis fenntartását elvben segíteni képes PARP inhibitor L-2286 alkalmazása során azt vizsgáltuk, képes-e a DAI gátlására, és az esetlegesen megfigyelhető kvalitatív és kvantitatív axon-szerkezeti változásokkal egyidejűleg a funkcionális kimenetel javulását is eredményezi-e?

Kísérleteink bevezetéseként a CSpT területén kimutatott APP-IR axonszakaszok denzitásának kvantitatív elemzésével kidogoztuk az L-2286 axonkárosodás gátlására vonatkozó dózis-hatásgörbéjét. Az ennek alapján alkalmazott L-2286 szignifikánsan csökkentette a CSpT területén mind az RMO-14, mind pedig az APP-IR axonszakaszok denzitását. Ez a hatás az MLF-ben is szignifikáns volt, ugyanakkor az RMO-14-IR axonok esetében a 30 perccel trauma után adott szer szignifikánsan kisebb mértékben csökkentette a károsodott, immunreaktív axonok denzitását, mint a sérülés után közvetlenül beadott L-2286. A magatartás vizsgálatok eredménye szerint a 30 perccel trauma után alkalmazott L-2286 szignifikánsan javította a rúdon való egyensúlyozás képességét.

A szorongási szintet és a motoros teljesítményt is mérő porond tesztek során a vivőanyag-kezelt állatok motoros tevékenysége az ál-operáltakéhoz képest szignifikánsan visszaesett. Az azonnal trauma után kezelt állatokban javulás nem volt észlelhető, míg a 30 perccel később kezeltékben kizárólag a szőrtisztítás (grooming) számában volt szignifikáns javulás.

Az emelt keresztpalló vizsgálatokban a vivőanyag kezelt állatok “féltek” a nem biztonságos területen tartózkodni; a vivőanyag kezelt illetve ál-operált állatok közt szignifikáns különbség volt a nyitott karba benézés, a nyitott karban töltött idő, a zárt karban töltött idő illetve a zárt karban végzett szórtisztítás ideje közt. Az L-2286 kezelt állatok szorongási szintje szignifikánsan alacsonyabbnak adódott, mint a vivőanyag kezeltéké: több időt töltöttek a nyitott-, és kevesebbet a zárt karban.

Következtetések. A Marmarou-féle impakt akcelerációs modell okozta diffúz agy-szerkezetkárosodás korábbi vizsgálatok szerint egyúttal a motoros és magatartási/kognitív funkciók károsodását is eredményezi ^{47,165}.

A PARP-inhibitor L-2286 axonoprotektív hatásának igazolása mellett a vizsgálatok -az APP-IR és RMO-14-IR axonok denzitásának eltérő mértékű csökkenését mutatva- ismét megerősítették, hogy az axonkárosodás heterogén jelenség, mely nem minden tengelyfonatban jelenti ugyanazon kórfolyamatok aktiválódását ^{73,152}. Ez is arra utal, hogy az igazságügyi orvos szakértői gyakorlatban évtizedek óta a DAI elsődleges markerének tartott APP-IR alulbecsüli a károsodott axonok számát, és akár téves negatív véleményre is vezethet.

A funkcionális kimenetelt értékelő magatartási vizsgálataink eredményét összegezve megállapítható, hogy a diffúz axonális sérülés kiváltására alkalmazott állatkísérletes modellben, amely elsősorban a motoros rendszert károsítja, a PARP-inhibitorral történő utókezelés képes javítani a trauma következtében károsodott motoros teljesítményt és nagymértékben csökkenteni a trauma után kialakuló szorongás szintjét.

Az, hogy a PARP-inhibitor e pozitív hatását kizárólag a DAI gátlása útján fejti-e ki, avagy ebben szerepet játszhat a Marmarou-féle IA koponyatrauma modellben Farkas, Lifshitz és mások vizsgálataival igazolt diffúz neurális károsodás kivédése is ^{31,56,67}, jelen vizsgálatainkkal nem megválaszolható.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Eredményeink a koponyasérülés kiváltotta diffúz axonkárosodás kórereditének megértését, patobiológiai ésszerűséggel megalapozott kísérletes és klinikai gyógyeljárások kifejlesztését, az agysérülés klinikai monitorozását és kimenetelének megítélését szolgáló biomarker panel és prognosztikai rendszer kidolgozását szolgálták.

Azonosítottuk a trauma kiváltotta diffúz axonkárosodás fehérjebontó folyamatait, köztük nem ismert, elvi jelentőségű, apoptotikus-nekrotikus enzimkapcsolatot tárva fel.

Évtizedes alapkutatói munka eredményeként alkalmazott klinikai kutatásokat indítottunk el (proteolitikus biomarkerek) illetve klinikai fázisba került gyógyszerkísérletek elvi alapjait raktuk le (cyclosporin-A).

A munkának otthont adó neuropatológiai laboratóriumban nemzetközileg elfogadott neurotrauma-modelleken, korszerű monitorozási feltételek közt végzett ígéretes kísérletes terápiás vizsgálatok nemcsak az axonkárosodás kórfolyamatának megértését segítették elő, de új fejezetet nyithatnak a különböző súlyosságú diffúz axonkárosodás kezelésében is.

A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázissal az Országban egyedülálló, az ellátási protokollok auditálásától a prognosztikai faktorok meghatározásán át a sérültek kognitív, endokrinológiai követésére, alkalmazott klinikai kutatások folytatására alkalmas rendszert dolgoztunk ki.

A „Célkitűzések” szerint részletezve (zárójelben az értekezés alapjául szolgáló közlemények hivatkozási száma /ld:7.3./):

1., Fény- és elektronmikroszkópos IHC bizonyítékot szolgáltatunk arra a régi feltevésre, hogy a DAI kórfolyamatában a strukturális fehérjéket bontó ciszteín proteáz, a calpain aktiválódik (**1, 2, 3, 4**).

2., Peroxidáz alapú IHC vizsgálatainkkal a confocális mikroszkópos módszerek elterjedése előtt elsőként írtuk le a calpain aktiválódás térbeli, időbeli sajátosságait. Igazoltuk, hogy a DAI során e folyamatok nem „minden vagy semmi” jellegű, irreverzibilis aktiválódást mutatnak, hanem időben és az axon-cylindereken belül ultrastrukturálisan is jól meghatározott, „kompartmentalizált” forgatókönyv szerint zajlik a proteolysis. A kompartmentalizáció illetve az elhúzódó enzim-aktiválódás új terápiás célpontként azonosította a calpain-mediálta fehérjebontás folyamatát (**1, 2, 3**).

3., Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelöléses vizsgálataink az elsők, melyek a trauma hatására károsodott axon-szegmentumokban a Ca^{2+} -indukálta, calpain-mediálta spectrin-proteolysis és a DAI klasszikus markereinek, azaz az axoplazmatikus transzportzavart mutató APP akkumuláció és a neurofilamentumok kompaktálódásának kolokalizációját igazolták, a citoskeletális elváltozásokkal kapcsolatos tér- és időbeli viszonyát feltárták (**1, 2, 3**).

4., A peroxidáz- alapú, azaz elektronmikroszkópiára jól konvertálható, de fénymikroszkópos vizsgálatok során körülményesen használható-, illetve az elektronmikroszkóposan nem megközelíthető, de fluoreszcens mikroszkópban látványos kettős jelölési technikák illetve a tyramide jel-felerősítési módszer (TSA) előnyeit ötvöző szövettani technikát dolgoztunk ki. E folyamat során sikerült egyúttal a TSA-technika költségghatékonyabb, megbízhatóbb, jobb jel/zaj (specifikus/háttér-festés) arányát is biztosítani.

Vizsgálataink további bizonyítékot szolgáltatottak a calpain-mediált spectrin fehérjebontás és a neurofilament-kompaktáció kapcsolatára vonatkozó korábbi fény- és elektronmikroszkópos megfigyeléseink alátámasztásához (3).

5., Fény- és elektronmikroszkópos IHC vizsgálatokkal, az extra-mitochondriálisan elhelyezkedő cytochrome-c kimutatásával elsőként igazoltuk, hogy a DAI kialakulása során észlelt mitochondrium károsodás cytochrome-c felszabadulással jár együtt. Ugyancsak először szolgáltatunk fénymikroszkópos és finomszerkezeti bizonyítékot a cytochrome-c felszabadulással közvetlen kapcsolatba hozható caspase aktiválódásra diffúz agysérülés kísérletes modelljében károsodott axonokban (4,5).

6., Fluorescens kettős-jelölési technikák alkalmazásával a confocális technika elterjedése előtt igazoltuk, hogy a Ca^{2+} -indukált, calpain-mediált spectrin-proteolysis és a mitochondriális károsodás hatására kialakuló cyto-c felszabadulás azonos axonszakaszokban kolokalizált jelenség, s ezzel igazoltuk azt a feltevést, hogy a calpain-mediálta fehérjebontó folyamatok közvetve (lokális Ca^{2+} beáramlás fokozása) vagy közvetlenül (MTP spectrin komponensének emésztése) szerepet játszhatnak a mitochondriális károsodás kialakulásában.

A fenti módszertannal azt is megállapítottuk, hogy a cytochrome-c felszabadulás és a caspase-3-mediált fehérjebontás egyazon károsodott axon szakaszban egyidejűleg fordul elő, igazolva, hogy az apoptoticus enzim aktiválódásának feltétele és vélhetően oka a mitochondriális károsodás hatására kialakuló cyto-c felszabadulás.

A caspase-3 aktivált formája elleni antitest és a caspase által a spectrinből kihalásított kézjegy fehérje egyazon axon-locusban történő kimutatásával elsőként értük tetten tengelyfonatokban az apoptózis végrehajtó enzimjének aktiválódását, bizonyítékot szolgáltatva az irreverzibilis axonális károsodás feltételeinek kialakulására.

A mitochondriális károsodásra vonatkozó megfigyeléseink és korábbi kísérletes terápiás vizsgálataink megalapozták a cyclosporin-A klinikai kipróbálását súlyos koponyasérülést szenvedett betegeken (4, 5).

7., A fluorescens kettős-jelölési technikák alkalmazásával, és „kézjegy”-fehérjék kimutatásával először igazoltuk, hogy a két cisztein proteáz enzim, a nekrotikus folyamatok „végrehajtója” a calpain és az apoptotikus kaszkád végső enzime, a caspase-3 egyazon axonokban aktiválódik. A fentiekben összegzett folyamatok és a caspase aktiválódásra vonatkozó elektronmikroszkópos megfigyelések alapján megállapítottuk, hogy a DAI kórfolyamatában a caspase aktiválódása képezheti az irreverzibilis fázist, a „point of no return”-t (4, 5, 6).

8., Előzetes vizsgálatainkkal elsőként tisztáztuk, hogy a diffúz koponya-agysérülés kísérletes modelljében kialakuló axonális károsodás az azt kiváltó mechanikai energiával és a sérülés után eltelt idővel arányos, ugyanakkor a károsodott axonok morfológiai és immunfestési tulajdonságaiban érdemi különbség nincs (7).

9., A diffúz koponya-agysérülés gyorsuláson- lassuláson alapuló kísérletes modelljében tett felfedezésünk szerint az agytörzsi axonkárosodás mellett kiterjedt, a gerincvelő távoli szakaszain észlelhető axonális sérülés is fellép, mely magyarázatot adhat az e modellben észlelhető motoros károsodás egy részére.

Az eredmények felvetik a gerincvelő elemzésének fontosságát bántalmazott gyermek-szindróma esetén és új adatokkal szolgálnak a spondylosis myelopathia illetve a centrális gerincvelő syndroma kialakulására vonatkozóan is (8).

10., A fenti vizsgálatokkal elsőként írtuk le részletesen a gerincvelőben koponyasérülés hatására létrejövő DAI jelenségét, és a sérülést kiváltó mechanikai energiával valamint a sérüléstől eltelt idővel történő összefüggését.

Megállapítottuk, hogy az IA koponyatrauma modellben a koponyasérülés súlyosságával és a sérüléstől eltelt idővel arányos mértékű DAI jön létre a gerincvelőben.

Azt is igazoltuk, hogy a kísérleti állaton detektálható érdemi neurológiai illetve fiziológiai változásokkal nem járó súlyosságú koponyatrauma is képes jelentős mértékű diffúz axonkárosodás kiváltására.

E megfigyelésünkkel kísérletes körülmények között biztosítottunk patobiológiai bizonyítékot az emberben minimális fejsérülés mellett létrejövő post-traumás tünet együttes hátterében képalkotó vizsgálatokkal felvetett DAI fennállására (8).

11., Alaputatási vizsgálataink eredményei alapján kezdett agyvíz gyűjtéssel és elemzéssel igazoltuk és emberben elsőként írtuk le azt, hogy a spectrin nevű agyi struktúrfehérje és lebontási termékei az agyvízben baleseti agysérülés hatására kimutathatók.

Ugyancsak elsőként igazoltuk, hogy e jelenség nem csupán az emelkedett intracraniális nyomástól függ, illetve leírtuk a spectrin és lebontási termékei agykamrában történő megjelenésének időbeni lefolyását.

Megfigyeléseink alapján a súlyos koponyasérültek neuro-intenzív monitorozását és a terápia személyre szabását elősegítő biomarkerek azonosítására nyílt lehetőségek; e feltételezést nemzetközi kollaborációban vizsgáljuk tovább (9, 10, 11, 12, 13, 16).

12., A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis létrehozásával országosan egyedülálló ellátás-auditálási és beteg-követési rendszert alapoztunk meg.

Az adatbázis elemzésével a koponyasérülés kimenetelére vonatkozó prognosztikai faktorokat azonosítottunk és igazoltuk, hogy a felvételi CT képek digitális elemzésével a kimenetelt előre jelző adatok nyerhetőek, melyek jóval pontosabbak, mint a korábban használt filmfelvétel-alapú becslések.

Azt is igazoltuk, hogy a nemzetközi gyakorlatban használatos, CT-alapú prognosztikai rendszerek pontossága jelentősen növelhető további CT-anatómiai jellemzők valamint demográfiai adatok csatolásával (13, 14, 15, 16).

13., Elsőként igazoltuk, hogy a szelektív calpain inhibitor MDL-28170 alkalmazásával az axonkárosodás markereivel jelölt, DAI morfológiai jeleit mutató axonok előfordulása szignifikánsan csökkenthető (17).

14., Megállapítottuk, hogy az MDL-28170 trauma előtt adva a CSpT területén gátolja az axolemma trauma hatására kialakult permeabilitási zavarának súlyosbodását illetve tovaterjedését. Vizsgálataink ismét megerősítették az axolemma mechanoporációjának jelenségét illetve elsőként igazolták, hogy a permeabilitási zavarok, legalábbis részben, visszaszoríthatók a calpain aktiváció gátlása útján (18).

15., Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a más központi idegrendszeri elváltozásokban bevált PACAP adagolás hatástalan a DAI esetében.

Feltérképeztük az icv. adott PACAP axon károsodás-gátlásra vonatkozó dózis- hatás-görbéjét és igazoltuk annak jótékony hatását, közvetlenül a sérülés után adva.

Ezek voltak az első vizsgálatok, melyek a PACAP diffúz agysérülésben, axonkárosodásban feltételezhető neuroprotektív szerepét igazolták (19).

16., A PACAP illetve analógjai esetleges klinikai kipróbálásának alapfeltételét biztosítandó, meghatároztuk az axonkárosodás gátlására vonatkozó terápiás ablakot, mely legalább egy órának adódott, ami az axonkárosodás kivédésére vonatkozó állatkísérletes vizsgálatokban kifejezetten hosszúnak számít; ez a későbbi klinikai kipróbálás előfeltétele lehet **(20)**.

17., A PACAP illetve analógjai klinikai kipróbálásának további alapfeltételként igazoltuk, hogy más diffúz agysérülési modellben is képes az axonkárosodás kivédésére. Elsőként vizsgáltuk és igazoltuk, hogy a PACAP folyadék perkussziós koponyasérülési modellben kivédi az axoplazmaticus transzport-zavar kialakulását. Vizsgálataink ismételten rávilágítottak a DAI-t előidéző kórfolyamatok sokszínűségére és felhívták a figyelmet arra, hogy az igazságügyi orvostani gyakorlatban a DAI markereként használt APP-IHC nem képes az axonkárosodás teljes spektrumának kimutatására **(21)**.

18., Vizsgálatainkkal meghatároztuk a PARP-inhibitor L-2286 axonkárosodás kivédésére vonatkozó dózis-hatás görbéjét. Elsőként igazoltuk, hogy a PARP-inhibitor L-2286 szignifikánsan csökkenti a DAI mértékét, és egyúttal arra is bizonyítékot szolgáltatunk, hogy ez az axono-protéktív hatás a funkcionális kimenetel javításában is megnyilvánul, amennyiben a PARP-inhibitor kezelt állatok koponya-agysérülés utáni motoros aktivitása és szorongási szintje szignifikáns javulást mutat a kontrollokéhoz képest. Eredményeink ismételten igazolják, hogy a diffúz agysérülés kórfolyamatában az energia háztartás helyreállítása, a lokális energia háztartás fenntartása kulcsszerepet játszhat **(22)**.

6. IRODALOM

1. Adams JH: Diffuse axonal injury in non-missile head injury. *Injury* 13:444-445, 1982
2. Adams JH, Doyle D, Ford I, et al: Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 15:49-59, 1989
3. Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA: Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 32:15-30, 1983
4. Aguilar HI, Botla R, Arora AS, et al: Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: a mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology* 110:558-566, 1996
5. Atlasz T, Babai N, Kiss P, et al: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 153:108-114, 2007
6. Babai N, Atlasz T, Tamas A, et al: Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox Res* 8:227-233, 2005
7. Banks WA, Kastin AJ, Arimura A: Effect of spinal cord injury on the permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to the neurotrophin PACAP. *Exp Neurol* 151:116-123, 1998
8. Bartus R: The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common cytotoxic pathway. *Neuroscientist* 3:314-327, 1997
9. Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, et al: Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:969-979, 1995
10. Berger RP: The use of serum biomarkers to predict outcome after traumatic brain injury in adults and children. *J Head Trauma Rehabil* 21:315-333, 2006
11. Besson VC, Zsengeller Z, Plotkine M, et al: Beneficial effects of PJ34 and INO-1001, two novel water-soluble poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, on the consequences of traumatic brain injury in rat. *Brain Res* 1041:149-156, 2005
12. Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, et al: Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 344:1055-1056, 1994
13. Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, et al: Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1132-1141, 1997
14. Buki, A. and Barzo, P. A központi idegrendszer sebészete. In: *Sebészet 7. átdolg.kiad., Szerk.: Gaál Cs.Medicina.* 2010. Ref Type: In Press
15. Buki A, Koizumi H, Povlishock JT: Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp Neurol* 159:319-328, 1999
16. Buki A, Kovesdi E, Pal J, et al: Clinical and Model Research of Neurotrauma, in Ottens AK, Wang KK (eds): *Neuroproteomics.* Humana Press, 2009, Vol 566, pp 41-57
17. Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT: Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 16:511-521, 1999
18. Buki A, Povlishock JT: All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 148:181-193, 2006
19. Buki A, Siman R, Trojanowski JQ, et al: The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:365-375, 1999
20. Burkle A: Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays* 23:795-806, 2001
21. Cardali S, Maugeri R: Detection of alphaII-spectrin and breakdown products in humans after severe traumatic brain injury. *J Neurosurg Sci* 50:25-31, 2006
22. Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, et al: Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci* 9:565-572, 2002
23. Christman CW, Grady MS, Walker SA, et al: Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *J Neurotrauma* 11:173-186, 1994
24. Compagnone C, D'Avella D, Servadei F, et al: Patients with moderate head injury: a prospective multicenter study of 315 patients. *Neurosurgery* 64:690-696, 2009
25. Csepregi G, Buki A, Futo J, et al: [Management of patients with severe head injury in Hungary, in 2002]. *Orv Hetil* 148:771-777, 2007
26. Delgado M, Leceta J, Ganea D: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 73:155-164, 2003
27. Diakowski W, Sikorski A: Brain spectrin exerts much stronger effect on anionic phospholipid monolayers than erythroid spectrin. *Biochim Biophys Acta* 1564:403-411, 2002

28. Diakowski W, Sikorski AF: Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids. *Biochemistry* 34:13252-13258, 1995
29. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, et al: A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67:110-119, 1987
30. Erb DE, Povlishock JT: Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat. *Acta Neuropathol* 76:347-358, 1988
31. Farkas O, Lifshitz J, Povlishock JT: Mechanoporation induced by diffuse traumatic brain injury: an irreversible or reversible response to injury? *J Neurosci* 26:3130-3140, 2006
32. Foda MA, Marmarou A: A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80:301-313, 1994
33. Geddes JW, Bondada V, Tekirian TL, et al: Perikaryal accumulation and proteolysis of neurofilament proteins in the post-mortem rat brain. *Neurobiol Aging* 16:651-660, 1995
34. Gennarelli TA, Graham DI: Neuropathology of the Head Injuries. *Semin Clin Neuropsychiatry* 3:160-175, 1998
35. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, et al: Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 12:564-574, 1982
36. Gennarelli TA, Thibault LE, Tipperman R, et al: Axonal injury in the optic nerve: a model simulating diffuse axonal injury in the brain. *J Neurosurg* 71:244-253, 1989
37. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, et al: Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 160:139-144, 1993
38. Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, et al: Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res Bull* 36:593-606, 1995
39. Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, et al: Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta* 1366:167-175, 1998
40. Grady MS, McLaughlin MR, Christman CW, et al: The use of antibodies targeted against the neurofilament subunits for the detection of diffuse axonal injury in humans. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:143-152, 1993
41. Greenberg MS: *Handbook of Neurosurgery*. 1996, pp 10-26
42. Greenwood JA, Troncoso JC, Costello AC, et al: Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem* 61:191-199, 1993
43. Gross A, Yin XM, Wang K, et al: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274:1156-1163, 1999
44. Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, et al: Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma* 22:252-265, 2005
45. Hamm TM: Recurrent inhibition to and from motoneurons innervating the flexor digitorum and flexor hallucis longus muscles of the cat. *J Neurophysiol* 63:395-403, 1990
46. Hayashi M, Inomata M, Saito Y, et al: Activation of intracellular calcium-activated neutral proteinase in erythrocytes and its inhibition by exogenously added inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1094:249-256, 1991
47. Heath DL, Vink R: Impact akceleración-induced severe diffuse axonal injury in rats: characterization of phosphate metabolism and neurologic outcome. *J Neurotrauma* 12:1027-1034, 1995
48. Hong SC, Lanzino G, Goto Y, et al: Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res* 661:43-50, 1994
49. Hortobagyi T, Gorlach C, Benyo Z, et al: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase-mediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. *Neuroscience* 121:983-990, 2003
50. Hukkelhoven CW, Steyerberg EW, Habbema JD, et al: Predicting outcome after traumatic brain injury: development and validation of a prognostic score based on admission characteristics. *J Neurotrauma* 22:1025-1039, 2005
51. Hunyady B, Krempels K, Harta G, et al: Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 44:1353-1362, 1996
52. Ingebrigtsen T, Romner B: Biochemical serum markers of traumatic brain injury. *J Trauma* 52:798-808, 2002
53. Jafari SS, Maxwell WL, Neilson M, et al: Axonal cytoskeletal changes after non-disruptive axonal injury. *J Neurocytol* 26:207-221, 1997
54. Jafari SS, Nielson M, Graham DI, et al: Axonal cytoskeletal changes after nondisruptive axonal injury. II. Intermediate sized axons. *J Neurotrauma* 15:955-966, 1998
55. Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, et al: Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update. *J Neurotrauma* 14:121-134, 1997

56. Kelley BJ, Farkas O, Lifshitz J, et al: Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and Wallerian degeneration. *Exp Neurol* 198:350-360, 2006
57. Kim WK, Kan Y, Ganea D, et al: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 20:3622-3630, 2000
58. Koizumi H, Povlishock JT: Posttraumatic hypothermia in the treatment of axonal damage in an animal model of traumatic axonal injury. *J Neurosurg* 89:303-309, 1998
59. Komjati K, Besson VC, Szabo C: Poly (adp-ribose) polymerase inhibitors as potential therapeutic agents in stroke and neurotrauma. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:179-194, 2005
60. Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH, et al: Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 91:493-500, 1999
61. Kupina NC, Detloff MR, Dutta S, et al: Neuroimmunophilin ligand V-10,367 is neuroprotective after 24-hour delayed administration in a mouse model of diffuse traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1212-1221, 2002
62. Kupina NC, Nath R, Bernath EE, et al: The novel calpain inhibitor SJA6017 improves functional outcome after delayed administration in a mouse model of diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 18:1229-1240, 2001
63. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM: The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 21:375-378, 2006
64. LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, et al: Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 18:369-376, 2001
65. Lee VM, Carden MJ, Schlaepfer WW, et al: Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. *J Neurosci* 7:3474-3488, 1987
66. Leker RR, Shohami E: Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 39:55-73, 2002
67. Lifshitz J, Kelley BJ, Povlishock JT: Perisomatic thalamic axotomy after diffuse traumatic brain injury is associated with atrophy rather than cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:218-229, 2007
68. Lockshin RA, Zakeri Z: Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419, 2004
69. Maas AI, Lingsma HF: New approaches to increase statistical power in TBI trials: insights from the IMPACT study. *Acta Neurochir Suppl* 101:119-124, 2008
70. Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, et al: Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29:152-158, 1998
71. Marmarou A, Foda MA, van den BW, et al: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300, 1994
72. Marmarou A, Lu J, Butcher I, et al: IMPACT database of traumatic brain injury: design and description. *J Neurotrauma* 24:239-250, 2007
73. Marmarou CR, Povlishock JT: Administration of the immunophilin ligand FK506 differentially attenuates neurofilament compaction and impaired axonal transport in injured axons following diffuse traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197:353-362, 2006
74. Marmarou CR, Walker SA, Davis CL, et al: Quantitative analysis of the relationship between intra-axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22:1066-1080, 2005
75. Martin D, Schoenen J, Lenelle J, et al: MRI-pathological correlations in acute traumatic central cord syndrome: case report. *Neuroradiology* 34:262-266, 1992
76. Maxwell WL: Histopathological changes at central nodes of Ranvier after stretch-injury. *Microsc Res Tech* 34:522-535, 1996
77. Maxwell WL, Donnelly S, Sun X, et al: Axonal cytoskeletal responses to nondisruptive axonal injury and the short-term effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurotrauma* 16:1225-1234, 1999
78. Maxwell WL, Graham DI: Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibers. *J Neurotrauma* 14:603-614, 1997
79. Maxwell WL, Irvine A, Graham, et al: Focal axonal injury: the early axonal response to stretch. *J Neurocytol* 20:157-164, 1991
80. Maxwell WL, McCreath BJ, Graham DI, et al: Cytochemical evidence for redistribution of membrane pump calcium-ATPase and ecto-Ca-ATPase activity, and calcium influx in myelinated nerve fibres of the optic nerve after stretch injury. *J Neurocytol* 24:925-942, 1995
81. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL: A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *J Neurotrauma* 14:419-440, 1997
82. Maxwell WL, Watson A, Queen R, et al: Slow, medium, or fast re-warming following post-traumatic hypothermia therapy? An ultrastructural perspective. *J Neurotrauma* 22:873-884, 2005

83. Mazzeo AT, Brophy G, Gilman CB, et al: Safety and tolerability of cyclosporin A in severe traumatic brain injury patients: results from a prospective, randomized trial. *J Neurotrauma* 12:2195-206, 2009
84. McGinn MJ, Kelley BJ, Akinyi L, et al: Biochemical, structural, and biomarker evidence for calpain-mediated cytoskeletal change after diffuse brain injury uncomplicated by contusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:241-249, 2009
85. Meaney DF: Relationship between structural modeling and hyperelastic material behavior: application to CNS white matter. *Biomech Model Mechanobiol* 1:279-293, 2003
86. Meaney DF, Ross DT, Winkelstein BA, et al: Modification of the cortical impact model to produce axonal injury in the rat cerebral cortex. *J Neurotrauma* 11:599-612, 1994
87. Meaney DF, Smith DH, Shreiber DI, et al: Biomechanical analysis of experimental diffuse axonal injury. *J Neurotrauma* 12:689-694, 1995
88. Medana IM, Esiri MM: Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* 126:515-530, 2003
89. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574, 1989
90. Montal M: Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade. *Biochim Biophys Acta* 1366:113-126, 1998
91. Murray CJ, Lopez AD: Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-1442, 1997
92. Murray GD, Butcher I, McHugh GS, et al: Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 24:329-337, 2007
93. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, et al: Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 19:503-557, 2002
94. Neumar RW, Xu YA, Gada H, et al: Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 278:14162-14167, 2003
95. Newcomb JK, Kampfl A, Posmantur RM, et al: Immunohistochemical study of calpain-mediated breakdown products to alpha-spectrin following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 14:369-383, 1997
96. Newcomb JK, Pike BR, Zhao X, et al: Altered calpastatin protein levels following traumatic brain injury in rat. *J Neurotrauma* 16:1-11, 1999
97. Newcomb JK, Zhao X, Pike BR, et al: Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. *Exp Neurol* 158:76-88, 1999
98. Niogi SN, Mukherjee P, Ghajar J, et al: Extent of microstructural white matter injury in postconcussive syndrome correlates with impaired cognitive reaction time: a 3T diffusion tensor imaging study of mild traumatic brain injury. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:967-973, 2008
99. Niogi SN, Mukherjee P, Ghajar J, et al: Structural dissociation of attentional control and memory in adults with and without mild traumatic brain injury. *Brain* 131:3209-3221, 2008
100. Nonaka N, Banks WA, Mizushima H, et al: Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. *Peptides* 23:2197-2202, 2002
101. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, et al: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245, 1998
102. Okonkwo DO, Buki A, Siman R, et al: Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury. *Neuroreport* 10:353-358, 1999
103. Okonkwo DO, Melon DE, Pellicane AJ, et al: Dose-response of cyclosporin A in attenuating traumatic axonal injury in rat. *Neuroreport* 14:463-466, 2003
104. Okonkwo DO, Pettus EH, Moroi J, et al: Alteration of the neurofilament sidearm and its relation to neurofilament compaction occurring with traumatic axonal injury. *Brain Res* 784:1-6, 1998
105. Okonkwo DO, Povlishock JT: An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:443-451, 1999
106. Pant HC: Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 256:665-668, 1988
107. Pellow S, Chopin P, File SE, et al: Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167, 1985
108. Pettus EH, Christman CW, Giebel ML, et al: Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. *J Neurotrauma* 11:507-522, 1994
109. Pettus EH, Povlishock JT: Characterization of a distinct set of intra-axonal ultrastructural changes associated with traumatically induced alteration in axolemmal permeability. *Brain Res* 722:1-11, 1996
110. Pike BR, Flint J, Dave JR, et al: Accumulation of calpain and caspase-3 proteolytic fragments of brain-derived alphaII-spectrin in cerebral spinal fluid after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:98-106, 2004

111. Pike BR, Flint J, Dutta S, et al: Accumulation of non-erythroid alpha II-spectrin and calpain-cleaved alpha II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 78:1297-1306, 2001
112. Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, et al: Stretch injury causes calpain and caspase-3 activation and necrotic and apoptotic cell death in septo-hippocampal cell cultures. *J Neurotrauma* 17:283-298, 2000
113. Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, et al: Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 9:2437-2442, 1998
114. Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, et al: Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 52:505-520, 1998
115. Pineda JA, Lewis SB, Valadka AB, et al: Clinical significance of alphaII-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24:354-366, 2007
116. Pineda JA, Wang KK, Hayes RL: Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14:202-209, 2004
117. Posmantur R, Kampfl A, Siman R, et al: A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 77:875-888, 1997
118. Posmantur RM, Newcomb JK, Kampfl A, et al: Light and confocal microscopic studies of evolutionary changes in neurofilament proteins following cortical impact injury in the rat. *Exp Neurol* 161:15-26, 2000
119. Povlishock JT: Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta Neuropathol* 70:53-59, 1986
120. Povlishock JT: Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. *Brain Pathol* 2:1-12, 1992
121. Povlishock JT: Pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and man. *Ann Emerg Med* 22:980-986, 1993
122. Povlishock JT: The future of combinational therapy in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 26:923, 2009
123. Povlishock JT, Becker DP: Fate of reactive axonal swellings induced by head injury. *Lab Invest* 52:540-552, 1985
124. Povlishock JT, Becker DP, Cheng CL, et al: Axonal change in minor head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 42:225-242, 1983
125. Povlishock JT, Buki A, Koizumi H, et al: Initiating mechanisms involved in the pathobiology of traumatically induced axonal injury and interventions targeted at blunting their progression. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 73:15-20, 1999
126. Povlishock JT, Christman CW: The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 12:555-564, 1995
127. Povlishock JT, Erb DE, Astruc J: Axonal response to traumatic brain injury: reactive axonal change, deafferentation, and neuroplasticity. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1:S189-S200, 1992
128. Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, et al: Impact aceleración injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:347-359, 1997
129. Povlishock JT, Pettus EH: Traumatically induced axonal damage: evidence for enduring changes in axolemmal permeability with associated cytoskeletal change. *Acta Neurochir Suppl* 66:81-86, 1996
130. Quencer RM, Bunge RP, Egnor M, et al: Acute traumatic central cord syndrome: MRI-pathological correlations. *Neuroradiology* 34:85-94, 1992
131. Ringger NC, O'Steen BE, Brabham JG, et al: A novel marker for traumatic brain injury: CSF alphaII-spectrin breakdown product levels. *J Neurotrauma* 21:1443-1456, 2004
132. Roberts-Lewis JM, Savage MJ, Marcy VR, et al: Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J Neurosci* 14:3934-3944, 1994
133. Saatman KE, Abai B, Grosvenor A, et al: Traumatic axonal injury results in biphasic calpain activation and retrograde transport impairment in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:34-42, 2003
134. Saatman KE, Bozyczko-Coyne D, Marcy V, et al: Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:850-860, 1996
135. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, et al: Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 25:719-738, 2008
136. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK: The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma* 15:1047-1058, 1998
137. Saatman KE, Murai H, Bartus RT, et al: Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3428-3433, 1996
138. Saatman KE, Zhang C, Bartus RT, et al: Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical lesion, or apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:66-73, 2000

139. Sandor J, Szucs M, Kiss I, et al: [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage]. *Ideggyogy Sz* 56:386-395, 2003
140. Schlaepfer WW, Zimmerman UJ: Calcium-activated proteolysis of intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* 455:552-562, 1985
141. Servadei F, Nasi MT, Giuliani G, et al: CT prognostic factors in acute subdural haematomas: the value of the 'worst' CT scan. *Br J Neurosurg* 14:110-116, 2000
142. Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, et al: Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol* 88:433-439, 1994
143. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S: Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:55-62, 1994
144. Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, et al: Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl* 73:7-13, 1999
145. Siesjo BK, Hu B, Kristian T: Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 19:19-26, 1999
146. Siman R, Baudry M, Lynch G: Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3572-3576, 1984
147. Siman R, Noszek JC: Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1:279-287, 1988
148. Siman R, Noszek JC, Kegerise C: Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci* 9:1579-1590, 1989
149. Smith DH, Chen XH, Xu BN, et al: Characterization of diffuse axonal pathology and selective hippocampal damage following inertial brain trauma in the pig. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:822-834, 1997
150. Somogyvari-Vigh A, Pan W, Reglodi D, et al: Effect of middle cerebral artery occlusion on the passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier in the rat. *Regul Pept* 91:89-95, 2000
151. Stone JR, Okonkwo DO, Dialo AO, et al: Impaired axonal transport and altered axolemmal permeability occur in distinct populations of damaged axons following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 190:59-69, 2004
152. Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT: Intra-axonal neurofilament compaction does not evoke local axonal swelling in all traumatically injured axons. *Exp Neurol* 172:320-331, 2001
153. Stone JR, Walker SA, Povlishock JT: The visualization of a new class of traumatically injured axons through the use of a modified method of microwave antigen retrieval. *Acta Neuropathol* 97:335-345, 1999
154. Sullivan HG, Martinez J, Becker DP, et al: Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. *J Neurosurg* 45:521-534, 1976
155. Sun X, Tang W, Zheng L: Ultrastructural observation of effect of moderate hypothermia on axonal damage in an animal model of diffuse axonal injury. *Chin J Traumatol* 5:355-360, 2002
156. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366:151-165, 1998
157. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, et al: Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma* 22:42-75, 2005
158. Tolia CM, Bullock MR: Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? *NeuroRx* 1:71-79, 2004
159. Uchino H, Elmer E, Uchino K, et al: Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 812:216-226, 1998
160. Uehara T, Kikuchi Y, Nomura Y: Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 72:196-205, 1999
161. Van Beek JG, Mushkudiani NA, Steyerberg EW, et al: Prognostic value of admission laboratory parameters in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 24:315-328, 2007
162. van Gijlswijk RP, Zijlmans HJ, Wiegant J, et al: Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45:375-382, 1997
163. Vaudry D, Cottet-Rousselle C, Basille M, et al: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits caspase-3 activity but does not protect cerebellar granule neurons against beta-amyloid (25-35)-induced apoptosis. *Regul Pept* 123:43-49, 2004
164. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, et al: The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13390-13395, 2000
165. Vink R, O'Connor CA, Nimmo AJ, et al: Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 336:41-44, 2003
166. Vos PE, van Voskuilen AC, Beems T, et al: Evaluation of the traumatic coma data bank computed tomography classification for severe head injury. *J Neurotrauma* 18:649-655, 2001

167. Wang KK: Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20-26, 2000
168. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, et al: Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 356:187-196, 1998
169. Wang KK, Posmantur R, Nath R, et al: Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273:22490-22497, 1998
170. Warren MW, Kobeissy FH, Liu MC, et al: Concurrent calpain and caspase-3 mediated proteolysis of alpha II-spectrin and tau in rat brain after methamphetamine exposure: a similar profile to traumatic brain injury. *Life Sci* 78:301-309, 2005
171. Wilkinson AE, Bridges LR, Sivaloganathan S: Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 98:197-202, 1999
172. Zamzami N, Kroemer G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:67-71, 2001
173. Zoratti M, Szabo I: The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:139-176, 1995

7. KÖZLEMÉNYEK

7.1. Az összes közlemény összesített impakt faktora: 64,765

PhD fokozat megszerzése utáni közlemények: **45,643**

PhD fokozat megszerzése előtti közlemények: **19,122**

Első és utolsó szerzős közlemények: **42,604**

Idézettség (2010.07.15.):

Összidézettség: 833

Független idézetek száma: 675

H-index (klasszikus): 11

H-index független idézetek alapján: 10

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 44,768

PhD fokozat megszerzése utáni közlemények: **39,178**

PhD fokozat megszerzése előtti közlemények: **5,590**

7.3. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1., **Büki, A.**, Siman, R., Trojanowski, J.Q., Povlishock, J.T. The Role of Calpain-Mediated Spectrin Proteolysis in Traumatically Induced Axonal Injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999; 58(4): 365-375.

2., Povlishock, J.T., **Büki, A.**, Koizumi, H., Stone, R.L., Okonkwo, D.O. Initiating Mechanisms Involved in the Pathobiology of Traumatically Induced Axonal Injury and Interventions Targeted at Blunting its Progression. *Acta Neurochirurgica Suppl.* 1999; 73:15-20.

3., **Büki, A.**, Walker, S.A., Stone, J.R., Povlishock, J.T. Novel Application of the Tyramide Signal Amplification (TSA): Ultrastructural Visualization of Double Labeled Immunofluorescent Axonal Profiles. *J. Histochem. Cytochem.* 2000; 48(1):153-162.

4., **Büki, A.**, Okonkwo, D.O., Wang, K.K.W., Povlishock, J.T. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *Journal of Neuroscience.* 2000; 20(8):2825-34.

5., **Büki, A.**, Povlishock, J.T. All Roads Lead to Disconnection? - Traumatic axonal injury revisited (Review) *Acta Neurochirurgica* 2006; 148(2):181-93

6., E. Kovcsdi, E. Czeiter, A. Tamas, D. Reglodi, D. Szellar, J. Pal, T. Doczi and **A. Büki** Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful? *Prog Brain Res.* 2007; 161:81-95.

7., **Büki A.**, Czeiter E., Farkas O., Zsombok A., Pál J., Dóczi T., Povlishock J.T. Development of Axonal Injury is Associated with the Impact and Survival Time. *Proceedings of EANS*, ISBN 88-323-3150-0 2003; 649-652.

8., Czeiter E., Pal J. Kovcsdi E., Bukovics P., Luckl J., Dóczi T., Povlishock J.T., **Büki A.** Traumatic Axonal Injury in the Spinal Cord Evoked by Traumatic Brain Injury *J Neurotrauma.* 2008 Mar; 25(3):205-13.

- 9., **Büki A.**, Farkas O., Polgár B., Szekeres-Barthó J., Zsombok A., Pál J., Dóczi T. and Povlishock J.T. Proteolytic Products in the Cerebrospinal Fluid in Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 88-323-3150-0 2003; 559-562.
- 10., Farkas O., Polgár B., Szekeres-Barthó J., Dóczi T., Povlishock J.T., **Büki A.** Spectrin breakdown products in the cerebrospinal fluid in severe head injury – Preliminary observations. Acta Neurochirurgica 2005; 147: 855-861.
- 11., 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. Clin Neurosci/Idegyogy Sz 2007; 60(7-8):284-295.
- 12., Kövesdi E., Lückl J., Bukovics P., Farkas O., Pál J., Czeiter E., Szellár D., Dóczi T., Komoly S., **Büki A.** Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. Acta Neurochirurgica 2010; 152(1):1-17.
- 13., Mondello S, Robicsek SA, Gabrielli A, Brophy G, Papa L, Tepas J, Robertson C, **Büki A**, Scharf D, Jixiang M, Akinyi L, Muller U, Wang KK, Hayes RL Spectrin Breakdown Products (SBDPs): Diagnosis and Outcome in Severe Traumatic Brain Injury Patients. J Neurotrauma 2010;27(7):1203-13.
- 14., Czeiter E., Ursprung Z., Kovacs Z., Ezer E, Kover F, Sandor J, Doczi T and **Büki A.:** Outcome Prediction with Marshall CT-classification and Rotterdam Score in Severe Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 978-88-7587-385-1 2007; 353-356.
- 15., Szellár D, Mezosi E, Kosztolanyi P, Nemes O, Nagy Zs, Bodis B, Bajnok L, Czeiter E, Doczi T and **Büki A:** Pituitary Insufficiency after Traumatic Brain Injury - Preliminary Data from the Pécs Traumatic Brain Injury Database. Proceedings of EANS, ISBN 978-88-7587-385-1 2007; 343-346.
- 16., **Büki A**, Kövesdi E, Pál J, Czeiter E. Clinical and model research of neurotrauma. Methods Mol Biol. 2009;566:41-55.
- 17., **Büki A**, Farkas, O., Kövér, F., Dóczi T.,: Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 significantly prevents traumatically induced axonal injury. J. Neurotrauma, 2003; 20(3):261-8.
- 18., Czeiter E, **Büki A**, Bukovics P., Farkas O., Pál J., Kövesdi E., Dóczi T., Sándor J: Calpain inhibition reduces axolemmal leakage in traumatic axonal injury Molecules 2009;14(12):5115-23.
- 19., Farkas O, Tamas A, Zsombok A, Reglodi D, Pal J, **Büki A**, Lengvari I, Povlishock JT, Doczi T: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. Regul Pept 2004; 123(1-3):69-75.
- 20., Tamás A., Zsombok A., Farkas O., Reglődi D., Pál J., **Büki A.**, Lengvári I., Povlishock JT, Dóczi T. Post-injury administration of PACAP attenuates traumatically induced axonal injury in rats. J. Neurotrauma 2006; 23(5):686-95.
- 21., Kövesdi E., Tamás A, Reglődi D, Farkas O., Pál J., Tóth G, Bukovics P., Dóczi T., **Büki A.** Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats Neurotx Res, 2008;13(2):71-78.
- 22., Kövesdi E., Bukovics P., Besson V.C., Nyirádi, J., Lückl J., Pál J., Hideg K., Dóczi T., Hernádi I., **Büki A.** A novel parp-inhibitor L-2286 in a rat model of impact akceleráció head injury: An immunohistochemical and behavioral study. International Journal of Molecular Sciences 2010;11(4) 1253-68.

7.4. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények:

- 1., **Büki, A**, Farkas, O., Kövér, F., Dóczi T.: A koponyasérülés által kiváltott axonkárosodás és kezelésének lehetőségei./ Therapeutic possibilities in axonal injury caused by head trauma. Orvosi Hetilap 2002, 143(10), 499-503.
- 2., Sándor J., Szücs M., Kiss I., Ember I., Csepregi Gy., Futó J., Vimláci L., Pál J., **Büki A.**, Dóczi T.: Subdurális vérzéssel kezelt betegek halálzási viszonyait befolyásoló tényezők. (Predictive factors for lethal outcome in subdural haemorrhage.) Clin Neurosci/Idegyogy Sz 2003; 56(11-12):386-395.
- 3., Czigner A, Mihaly A, Farkas O, **Büki A**, Krisztin-Peva B, Dobo E, Barzo P. Dynamics and regional distribution of c-fos protein expression in rat brain after a closed head injury. Int J Mol Med. 2004;14(2):247-52.
- 4., Czigner A; Mihaly A; Farkas O; **Büki A**; Krisztin-Peva B; Dobo E; Barzo P. Kinetics of the Cellular Immuneresponse following closed head injury. Acta Neurochirurgica 2007 149(3):281-9.
- 5., Futó J., **Büki A**, Sándor J., Csepregi Gy. Dóczi T., Súlyos koponyasérültek ellátása Magyarországon 2002-ben: prospektív felmérés. Treatment in severe TBI in Hungary in 2002: a prospective study. Orv Hetil 2007 148(17):771-7.
- 6., Martens-Lobenhoffer J, Sulyok E, Czeiter E, **Büki A**, Kohl J, Firsching R, Troger U, Bode-Boger SM. Determination of cerebrospinal fluid concentrations of arginine and dimethylarginines in patients with subarachnoid haemorrhage. J Neurosci Methods. 2007 164(1): 155-160.
- 7., Auer T, Schwarcz A, Ezer E, Czeiter E, Aradi M, Hudvágner S, Janszky J, **Büki A**, Dóczi T. [Diffusion tensor and functional MR imaging of severe traumatic brain injury at low magnetic field] Idegyogy Sz. 2007 Nov 30;60(11-12):480-8. Hungarian.

7.5. Elbírálás alatt:

- Brophy GM, Mondello S, Papa L, Robicsek SA, Gabrielli A, Tepas III J., **Büki A**, Robertson R, Tortella F, Wang KKW, Hayes RL Biokinetic analysis of ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH-L1) in severe traumatic brain injury patient biofluids. Submitted to: J. Neurotrauma
- Mondello S, Papa L, **Büki A**, Bullock R, Czeiter E, Tortella F, Wang KKW, Hayes RL Brain Damage Markers Following Severe Head Injury: Correlation with Computed Tomography Findings and Outcome Submitted to: Neurology

7.6. A Ph.D. fokozat megszerzése előtti közlemények:

- 1., **Büki A.**, Mészáros I., Kasó G., Dóczi T.: Simultaneous occurrence of unilateral multiplex meningiomas and syringomyelia. Clinical Neuroscience/Idegyógyászati Szemle, 1994; 47:161-163.
- 2., **Büki A.**, Horváth Z., Kövér F., Vető F., Dóczi T.: Subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis as a cause of occlusive hydrocephalus. European Journal of Neurology 1996; 3:1-7.
- 3., **Büki A.**, Horváth Z., Kövér F., Vető F., Dóczi T.: Subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis as a cause of occlusive hydrocephalus. (in Hungarian) [Sclerosis tuberósához társuló, elzáródásos hydrocephalust okozó III. kamra óriássejtes astrocytoma.] Gyermekgyógyászat/Pediatrics, 1996; 4:327-332.

- 4., Mészáros I., Kasó G., **Büki A.**, Hudvagner, S., Pfund, Z., Nagy, F., Dóczi T.: Effects of propofol and thiopental on median nerve somatosensory evoked potentials and cerebral blood flow velocity. *Clinical Neuroscience* 1997; 50:158-164.
- 5., **Büki A.**, Horváth Z., Fürtös A., Dóczi T.: Comparative human immunohistochemical investigations of peptidergic innervation of embryonal and adult cerebral blood vessels. *Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle*, 1997; 50:47-52.
- 6., **Büki, A.**, Siman, R., Trojanowski, J.Q., Povlishock, J.T. The Role of Calpain-Mediated Spectrin Proteolysis in Traumatically Induced Axonal Injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999; 58(4): 365-375.
- 7., Okonkwo, D.O., **Büki, A.**, Siman, R., Povlishock, J.T. Cyclosporin A Limits Calcium-Induced Axonal Damage Following Traumatic Brain Injury. *Neuroreport* 1999; 10(2): 353-358.
- 8., **Büki, A.**, Okonkwo, D.O., Povlishock, J.T. Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 1999; 16(6):511-21.
- 9., Povlishock, J.T., **Büki, A.**, Koizumi, H., Stone, R.L., Okonkwo, D.O. Initiating Mechanisms Involved in the Pathobiology of Traumatically Induced Axonal Injury and Interventions Targeted at Blunting its Progression. *Acta Neurochirurgica Suppl.* 1999; 73:15-20.
- 10., **Büki, A.**, Koizumi, H., Povlishock, J.T. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Experimental Neurology* 1999; 159:319-328.
- 11., **Büki A.**, Dóczi T., Gallyas F., Vető F., Horváth Z.: First clinical experiences with a combined pulsed Holmium-Neodymium-YAG - Laser in minimally invasive neurosurgery. *Minimally Invasive Neurosurgery*, 1999; 42(1):35-40.
- 12., Vajda, Zs., **Büki, A.**, Vető, F., Horváth, Z., Sándor, J., Dóczi, T. Transcranial Doppler-determined pulsatility index in the evaluation of endoscopic third ventriculostomy - Preliminary data. *Acta Neurochirurgica* 1999; 141(3): 247-250.
- 13., **Büki A.**, Dóczi T, Horváth Z., Kalló I., Liposits Zs., Lengvári I. Peptidergic innervation of human cerebral blood vessels and saccular aneurysms. *Acta Neuropathol.* 1999; 98(4):383-8.

7.7. Könyvfejezetek:

- 1., **Büki, A.**, Traumatically Induced Diffuse Axonal Injury (DAI) – Pathogenic and Therapeutic Considerations. In: EANS Course Book, Eds.: Garfield-Birkbeck, S., Benes, V., Kramár, F., 2001. Prague. Pg.:46-48.
- 2., Farkas, O., Polgár, B., **Büki, A.**, Szekeres-Barthó, J., Dóczi T.: Detection of Spectrin Breakdown Products in ventricular Cerebrospinal Fluid in Severe Traumatic Brain Injury In: Proceedings of EMN, 2002. Newcastle upon Tyne. Pg.:1-6.
- 3., **A.Büki**, E.Czeiter, O.Farkas, A.Zsombok, J.Pál, T.Dóczi and J.T.Povishock Development of Axonal Injury is Associated with the Impact and Survival Time. Proceedings of EANS, ISBN 88-323-3150-0 2003; 649-652.
- 4., **A.Büki**, O.Farkas, Polgár B., Szekeres-Barthó J., A.Zsombok, J.Pál, T.Dóczi and J.T.Povishock Proteolytic Products in the Cerebrospinal Fluid in Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 88-323-3150-0 2003; 559-562.

- 5., Pal J, **Büki A**, Zsombok A, Lückl J, Szellar D, Doczi TP, Povlishock JT Traumatic brain injury evokes axonal injury in the spinal cord. Proceedings of the INTS. 2004; 111-114.
- 6., Súlyos koponyasérültek prehospitális ellátásának irányelvei. (Guidelines for the prehospital care of the severely head injured) **Ford.: Büki A**, Oxyology/Mentésügy, 2005. IV.
- 7., **A. Büki**: Spontaneous intracerebral haemorrhage. EANS Training Course Book, Lisbon, 2007; p.109-10.
- 8., E. Czeiter, Z. Ursprung, N. Kovacs, E. Ezer, F. Kover, J. Sandor, T. Doczi and **A. Büki**: Outcome prediction with Marshall CT-classification and Rotterdam score in severe traumatic brain injury. Proceedings of EANS, 353-357; ISBN978-88-7587-385-1; Medimond 2007.
- 9., D. Szellar, E. Mezosi, P. Kosztolanyi, O. Nemes, Zs. Nagy, B. Bodis, L. Bajnok, E. Czeiter, T. Doczi, **A. Büki** Pituitary insufficiency after traumatic brain injury –preliminary data from the Pécs Traumatic Brain Injury Database. Proceedings of EANS, 343-347; ISBN978-88-7587-385-1; Medimond 2007.
- 10., Dóczi T, Horváth Á., Molnár P., Tóth J., Horváth Zs., **Büki A.**: Az idegrendszeri daganatok ellátása XXXIV.fej., 587-643. In: A komplex onkodiagnosztika és onkoterápia irányelvei. Szerk.: Dr.Kásler Miklós;
- 13., **Büki A.**: Central nervous system lymphoma. EANS Training Course Book, 2008 SEPTEMBER, Antwerp, 70-74.
- 14., **Büki A.**: Infections of the spine. EANS Training Course Book, 2008 FEBRUARY, Trondheim,
- 15., **Büki A**, Czeiter E, Dán L, Ezer E: Haematomas in anticoagulated patients. EANS Training Course Book, 2009 September, Opatija, 178-182.
- 16., **Büki A**, Kövesdi E, Pál J, Czeiter E. Clinical and model research of neurotrauma. Methods Mol Biol. 2009;566:41-55. PMID: 20058163
- 17., **Büki A**: Infections of the spine. EANS Training Course Book, 2010 FEBRUARY, Padua, 27-33.
- 18., **Büki A.**, Barzó P.: 25.fej. A központi idegrendszer sebészete. In: Sebészet 7.átdolg. kiad., Szerk.: Gaál Cs. Medicina, 2010. In Press, Budapest,

Köszönetnyilvánítás

Szerencsésnek mondhatom magam, mert azt tehetem, amit gyermekként megálmodtam. Hogy ez így történt, abban Szüleim, Családom gondoskodása és támogatása kivételesen fontos szerepet játszott.

Gimnáziumi tanárain, Rákosi Jenő, Gálffy Sándor, Barta Pálné adták az alapokat, melyet olyan kivételes mentorok építettek tovább, mint Merchenthaler István, Lengvári István, Lipostis Zsolt és Gallyas Ferenc Professzorok.

Flerkó Professzor Úr és Pörzsi József orvosi, emberi példamutatása pályakezdőként meghatározó volt.

Az Idegsebészeti Klinika minden Munkatársának hálával tartozom, nélkülük és a Neuropatológiai Laboratoriumban dolgozó kollégák, hallgatók nélkül e munka töredéke sem készült volna el, közülük is kiemelném Farkas Orsolya, Czeiter Endre, Kövesdi Erzsébet, Bukovics Péter, Pál József és Kovács Noémi segítségét.

A legfőbb hála és tisztelet Dóczi Professzor Úrénak, aki kivételes, türelmes mentorom-, minden törekvésemben kritikus támogatóm volt, kiállt azokért az értékekért, amik számomra fontosak voltak, követendő példát mutatott orvosként, sebészként, emberként.

Több mint két évtizedes barátságáért, tanácsaiért és támogatásáért köszönet Sándor Jánosnak, s hasonló hálás szívvel gondolok Reglódi Dórára, Tamás Andreára, Szelier Mártára és az Anatómia Intézet munkatársaira azért a segítségért, melyet diákkörösként, majd kutatóként tőlük kaptam.

Csepregi Gyula, Futó Judit, Varga Endre, Fehér Miklós, Jamshid Ghajar nemcsak támogatóim, példaképeim is, akik erőt adtak a néha szélmalom-harcnak tűnő klinikai kutatáshoz és irányelv-fejlesztéshez.

John Povlishock atyai barátom, mentorom, távolból is óvó, aggódó támogatásáért soha nem tudom eléggé kifejezni hálámat. Köszönet Ron Hayesnek és Munkatársainak, akik értelmét látták a közös munkának és rajtam keresztül a Klinikai Központot is kiemelten támogatták. Azok, akik mellettem voltak, folyamatosan áldozatot hoztak azért, hogy annyit dolgozhassam, amit munka-mániám megkövetelt; köszönet Sára, Bence és Bálint lemondásáért és hála Dórinak és Bálintnak, hogy ideális feltételeket teremtett ahhoz, hogy itthon is képes legyek túlélni a hétköznapokat, s legyen értelme mindannak, amit teszek.