

## MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS BÍRÁLATA

Bírálatra kaptam Dr. Büki András Zoltán „Fehérjebontó folyamatok diffúz agysérülésben: kísérletes vizsgálatoktól a klinikai felhasználásig” című értekezését.

### AZ ÉRTEKEZÉS FELÉPÍTÉSE, RÖVID TARTALMI ISMERTETÉSE:

A 140 oldal hosszú munka 1 oldal köszönetnyilvánítást, 5 oldalas tartalomjegyzéket, 2 oldalas rövidítésjegyzéket, 28 oldalas irodalomjegyzéket tartalmaz. Az értekezés végén a szerző 7 oldalon sorolja fel azokat a publikációkat, melyekben szerző, ill. társszerző. Külön tünteti fel az értekezés alapját jelentő 22 közleményt, ezekből 8-ban első szerző. A 22 cikk között egyetlen magyar nyelvű szerepel, a többi angol nyelvű publikáció.

A „Bevezetés” 2 oldal, amit 24 oldalas „Irodalmi áttekintés” követ. Az „Anyagok és módszerek” fejezet 20 oldalt tesz ki. Az eredmények ismertetése és megbeszélése összevonva történik, 40 oldal terjedelemben. A tartalmi részt 5 oldalas összefoglalás zárja, mely egyben a megfigyelések gyakorlati jelentőségére is kitér.

Az értekezés a szerző külföldi tanulmányútján szerzett, majd itthon alapított munkacsoportjának tagjai segítségével gyarapított munkásságát mutatja be, melynek során Kelet-Európában elsőként hozott/hoztak létre egy olyan klinikai-kutató központot, mely a koponyasérültek korszerű ellátásának hazai irányító bázisává vált. Az előző mondat alapján evidens, hogy az értekezés témaválasztása korszerű és rendkívül időszerű. A disszertáns erőfeszítései ellenére érvényes az a megállapítása, hogy ezen a területen nagyon sok a további tennivaló: hazánkban még mindig 50% feletti a koponyasérülések halálozási aránya, ami jelentősen elmarad a fejlett országok eredményeitől. Magyarországon évente mintegy 14000 koponyasérülést látnak el, ezek 9%-ában intraduralis („subduralis”) vérzés alakul ki. Ezeknek a betegeknek kb. 54%-a meghal (évente közel 700 haláleset). A túlélők közül csak minden negyedik illeszkedik vissza a konvencionális napi életbe!

Az értekezés a koponya trauma összetett kérdéskörén belül a diffúz agysérülés formákra, úm. diffúz vascularis ártalom, hypoxia okozta laesiók, agyduzzadás, axonális- és neuron (soma) károsodás összpontosít. A trauma során, ill. következtében dinamikus változások zajlanak (gyorsulás-lassulás), melyek elsődleges és másodlagos agykárosodáshoz vezetnek. Az értekezés elsődleges tárgya a diffúz axonális károsodás, a DAI (az angolszász betűszó a magyar szaknyelvben is meghonosodott).

Az **irodalmi áttekintés**ből (300 irodalmi hivatkozás) világos, hogy a DAI és az idegsejtek károsodása különböző lokalizációban eltérő sebességgel zajló és eltérő biokémiai pathomechanizmusú, sok szempontból az FM és EM képpel nehezen összhangba hozható módon következik be. (Calpain-indulálta proteolysis, necrosis, mechanoporáció, ER-stress, stb.).

A disszertáns **célkitűzéseit** 7 pontban foglalta össze. Ezek a DAI háttérében álló fehérjebontó folyamatok szerepének tanulmányozására, ill. a diffúz agysérüléshez társuló gerincvelői axonkárosodás háttérében álló energetikai viszonyok megértésére irányultak. Az alap kutatás jellegű célokhoz szervesen kapcsolódott 4 további cél. Ezek közül három a DAI kezelésében használható szerek kísérletes vizsgálatát jelentette. A disszertáns külön célként

jelölte meg, hogy a fehérjebontó folyamatok pathomechanikai jelentőségét a Pécssett létrehozott, „Súlyos Koponyasérült Adatbázis”-ra támaszkodva, klinikai beteganyagban tanulmányozza, ill. a súlyos agysérültek ellátásakor használható prognosztikai markereket keressen.

A vizsgálatok során használt **módszerek** ismertetése világos és érthető. Ezek között számos olyan eljárás szerepel, melyek fejlesztésében és nemzetközi közlésében a disszertáns jelentős szerepet vitt. A releváns hivatkozások alkalmat adtak arra, hogy a módszertani leírások a lényeges pontokra korlátozódjanak. Ez a megállapítás vonatkozik a neurotrauma állatkísérletes modelljeinek bemutatására csakúgy, mint a fény- és elektronmikroszkópos [EM] – több esetben párhuzamos vagy konszekutív – immunhisztokémiai (IHC) eljárások leírására. Az állatkísérletek során a Magyar Állatetikai Bizottság és a richmondi egyetemi etikai bizottság előírásait mindvégig követték, betartották. A morfológiai vizsgálatok értékelését az is biztonságossá tette, hogy a kísérletek során példamutató körültekintéssel ellenőrizték a kísérleti állatok élettani, laboratóriumi paramétereinek alakulását. Ismételt hangsúlyozandó, hogy a kísérletes neurotraumatológiai vizsgálatokhoz a kor színvonalának „Cadillac”-jeként értékelhető 2 alapberendezést megvásárolták. A technikai felszerelések a Virginia Commonwealth University technológiai intézetéből származnak. A készülékek egyike a súly-ejtéses modell, a másik a folyadékoszloppal történő ütés mechanizmusán alapszik.

Az irodalmi áttekintés kellően alátámasztja, hogy a diffúz axonális károsodás kezelésében a fehérjebontó folyamatok gátlása kedvező hatást eredményezhet. Ennek a hipotézisnek tesztelésére szelektív calpain gátlókat használtak. Miután a diffúz agysérülés hatásának kifejlődésében apoptoticus és necroticus folyamatok egyaránt szerephez jutnak, logikus volt, hogy az említett mechanizmusokat gátló „*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*” (PACAP) lehetséges terápiás hatásának tanulmányozása is szerepelt a célok között. Hasonlóképpen érthető, hogy PARP gátló hatású vegyülettel is folytattak kísérleteket.

A szövettani és IHC vizsgálatokhoz a mintákat a központi idegrendszer ún. "átáramoltatásos" (perfusio) rögzítését (fixálás) követően nyerték. Ezzel a post mortem műtermékek keletkezése minimálisra volt csökkenthető és a szövetminták ultrastruktúrális (EM) vizsgálatokra is alkalmassá váltak. Az IHC vizsgálatokban lehetőség volt arra, hogy kereskedelmi forgalomban nem kapható, de speciálisan a neurotraumatológia területére fejlesztett antitestekhez jussanak. *Ez a szerző nemzetközi kollaborációinak köszönhető, melyek csak úgy alakulhatnak ki, ha a szakterülettel foglalkozó, vezető kutatók, ill. cégek a kérelmező munkásságát relevánsnak és sikeresnek ítélik.* Az EM IHC eljárás alapvetően ún. „pre-embedding” technikán alapult, de a szerző és munkacsoportja a korábban ezen a területen alkalmazott eljárásokat módosította, amivel jobb detektálási érzékenységet értek el. Az egyes fény- és elektronmikroszkópos (FM, ill. EM) vizsgálatokhoz megfelelő kontrollokat használtak. A mikroszkópos feldolgozás során a „*state-of-the-art*” eljárásnak minősülő digitális képelemzést sikerrel használták.

A disszertáció külön kiemelendő értéke, hogy a morfológiai vizsgálatokkal párhuzamosan viselkedés-vizsgálatokról is beszámol. Példamutató gonddal elemzi a koponya trauma funkcionális következményeit olyan kísérleti körülmények között, melyek ismételtén újszerű experimentális modellt honosítanak meg egy klinikopathológiai kérdés komplex tanulmányozására. Így szerencsés – sajnos ritkán megvalósuló – lehetősége nyílik arra, hogy különlegesen érzékenyen hangolt képet adjon a szerkezet-működés egységben zajló – a sérülés következtében bekövetkező – folyamatok dinamizmusáról.

## EREDMÉNYEK

A. A szerző szakterületén megvalósított, általános, elvi- és gyakorlati jelentőséggel bíró teljesítmény:

Bár szokványos scientometriai módszerekkel nem vizsgálható eredmény, de **rendkívül jelentős, hogy a szerzők Kelet-Közép-Európában elsőként alakítottak**<sup>1</sup> ki egy olyan korszerű laboratóriumot, melyben a kor legmagasabb színvonalán álló kísérletes neurotrauma vizsgálatok elvégezhetők.

Megteremtették annak lehetőségét, hogy a koponyasérültek **klinikai ellátásában** támaszkodni lehessen az agyszövet parciális O<sub>2</sub> nyomásának („szöveti oxigenizáció”), hőmérsékletének, keringésének monitorizálására, ill. a csík-elektrodos EEG vizsgálatokra.

Más szakterületek által csak irigyelhető **klinikai adatbázist** hoztak létre abból a célból, hogy az általuk ellátott fejsérültek kórlefolyását, prognózisát, a károsodás végkimenetelét prospektív módon követni tudják.

B. Az állatkísérletekben tett megfigyelések.

1. Elsőként igazolták, hogy DAI kapcsán jelentőséggel bír és detektálható a calpain-mediálta spectrin proteolysis. FM és EM módszerekkel igazolták, hogy a Ca<sup>2+</sup>-indukálta fehérjebontás időben elhúzódó, progrediáló jelenség.

2. A morfológiai megfigyelésekre alapozva a DAI pathomechanizmusában szerephez jutó proteolysis folyamatát és az ehhez társuló szerkezeti elváltozások kialakulását időben és térben elkülöníthető, 5 lépésre osztották. Az egyes strukturális eltérések térbeli elkülönülésére (kompartimentalizáció) és időben elhúzódó kialakulására magyarázattal szolgáló új elméletet állítottak fel

3. Módszertani újítást dolgoztak ki a fluorescens kettős-jelölési eljárásokkal kapott eredmények EM szinten történő megjelenítésére. A „*tyramide signal amplification*” módszert leíró közleményben a disszertáns első szerző.

4. IHC eljárással igazolták, hogy a spectrin lebontást előidéző Ca<sup>2+</sup> beáramlás és a mitochondriális károsodás összefüggésben vannak egymással. Kettős IHC jelöléssel bizonyították, hogy az axonkárosodás kialakulásáért apoptoticus és necroticus jelátvivő rendszerekben keresztül megvalósuló folyamatok felelősek.

5. IHC-kolokalizációs módszerekkel sikerült bizonyítani, hogy a calpain-közvetítette fehérjebontás és az axoplasmaticus transport zavarát jelző APP felhalmozódás térben azonos axonsegmentekben zajlik; ugyanígy a neurofilamentumok tömörülése is megfigyelhető.

6. Elsőként mutatták meg, hogy a DAI kialakulásakor a mitochondriumok károsodása cytochrome-c felszabadulással jár.

7. Quantitatív módszerrel bizonyították, hogy a *noxa* súlyossága (az ezt előidéző mechanikai energia nagysága), ill. a károsító hatás után eltelt idő hossza egyenes arányban áll

---

<sup>1</sup>Az állítások a szerzőre, ill. az általa vezetett munkacsoportra értendők, ezért használom a többes szám 3. személy igei alakot).

a károsodást jelző szerkezeti eltérések területegységre vonatkoztatott mértékével („száma-val”).

8. Fontos klinikai és terápiás konzekvenciával járó megfigyelésük, hogy súlyos, acut klinikai tünetek hiányában is kialakulhat DAI, ill. a koponyasérült állatok gerincvelejének teljes hosszában megjelenik DAI. Ennek további vizsgálata jelentős eredményekkel kecsegtet a Törvényszéki Orvostan (L. „*Shaken baby syndrome*”) területén, ill. az ún. „*Centralis gerincve-lő syndroma*” pathomechanizmusának tisztázásában, majd kezelésében.

C. A pécsi „Súlyos Koponyasérült Adatbázis” elemzése.

Önmagában az adatbázis megteremtése előremutató és nagy jelentőséggel bíró ered-mény. Az adatok elemzése kezdeti fázisban van, de látszik arra esély, hogy a liquor cerebrospinalisban megjelenő spectrin és spectrin degradációs termékek mennyiségi elem-zése klinikailag használható jelző anyagokra hívja fel a figyelmet. Közvetlen, hazai, gyakorla-ti jelentőséggel bír annak megállapítása, hogy a koponyasérültek állapotának megítéléséhez rutin-szerűvé kell tenni a digitális képanalízist. El kell(ene) terjeszteni a szerző és munkacso-portja által kifejlesztett – a Marshall-féle beosztás és a Rotterdam score értékeit figyelembe vevő – modell alkalmazását.

D. A DAI kialakulását befolyásoló, a kimenetelt kedvezően befolyásoló kezelési próbálkozá-sok.

1. Calpain gátlóval megakadályozható az axolemmalis permeabilitási zavar generalizációja, ill. csökkenthető a DAI okozta morfológiai elváltozások gyakorisága.

2. Sikerül igazolni (a szerző szerint csak részben), hogy a trauma okozta axonkárosodással szemben a PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) alkalmazásának védő (protektív) hatása lehet. Meghatározták a szer dózis/hatás-görbét, az axonkárosodásra vonatkozó „terápiás ablakot”, valamint a hatásos adagolási módot.

3. A „PARP” (*Poly-ADP-ribose polymerase*) aktivitását gátló L-2286 anyag csökkentette az axonkárosodás mértékét a pyramis pályában és a lemniscus medialisban. Sikerült a dó-zis/hatás-görbe meghatározása erre a szerre vonatkozóan is. Igazolták, hogy a PARP-gátló alkalmazása a sérülést követően jelentkező psyches zavart (szorongás), valamint a motoros aktivitást kedvezően befolyásolta.

## KRITIKAI MEGJEGYZÉSEK

### 1. Az értekezés formájával és írásával kapcsolatos észrevételek:

A munka megfelel az ilyen típusú disszertációk formai követelményeinek, bár szokatlan, hogy az „Eredmények” és „Megbeszélés” (az eredmények diszkussziója) integrálva készült. A formabontó megoldás követi a célkitűzésekben felsorolt pontokat, ennél fogva esetenként a gondolatmenet kibontását könnyíti. A szerkesztéssel kapcsolatban általános megjegyzésem, hogy a szövegben – az áttekinthetőséget alapvetően segítő – „bekezdés” használata teljesen véletlenszerű, nagyon sokszor hiányzik.

Ennél nagyobb fajsúlyú formai hiba, hogy az ábrák csaknem mindegyike a kívánatosnál lényegesen kisebb, ami értékelésüket nagyon bizonytalanná teszi. A szöveges részben sze-replő – elsősorban EM elváltozásokat (neurofilamentum tömörülés, axon-szakadás,

microtubulusok számának csökkenése, a myelinhüvely fellazulása, periaxolemmalis terek képződése [61. o.] – ezeken a „miniatűr” képeken egyszerűen nem lehet bemutatni! A kettős jelölő anyaggal készült IHC képeken – ismét részben a képek nagysága, de a végleges formátum megválasztása miatt is – a részleteket nem lehet elemezni (a 13. A ábra fekete, a beeső fény változtatásával talán sejthető homályos kék szín megjelenése).

A jelölések (nyíl-, nyílhegy) alig láthatók, néhol hiányoznak. Az ábrákon és grafikonokon szereplő szöveges részek sokszor alig, néha egyáltalán nem olvashatók. A 3. ábra minősége elfogadhatatlan. Az elektronmikroszkópos képekről (ill. a kép szövegből) hiányzik a nagyítás, ami ebben az esetben sokkal inkább zavaró, mint a fénymikroszkópos, IHC ábrák kapcsán – ezek nagyítását ugyancsak fel kellett volna tüntetni!

Az értekezés olvasásakor csak elvétve fordul elő gépelési hiba (betű elütés). Ez a számítógépes szövegszerkesztés korában nem meglepő, sőt elvárható. Az viszont furcsa, hogy a helyesírást ellenőrző program igénybevétele ellenére az írásjelek használatakor konzekvens hibákat találtam. Pl. Az „illetve” és a „valamint” kötőszavak előtt kötelező a vessző, ami minden esetben hiányzik. Nem világos, hogy a calvaria varratai által kijelölt tájékozási pontok (lambda, bregma) miért nagybetűvel szerepelnek. Magyar szövegben az elektronmikroszkópia egybe írva helyes. Szerencsés lett volna az angolból átírt „kompakció” helyett az ugyanígy kifejező „tömörítés/tömörülés” használata.

Merőben szokatlan, hogy a számozott felsorolásokban a számot pont, majd vessző követi (1., -; 2., stb.). Mi indokolta ezt az írásjelhalmozást?

Az NO (a különböző sejtek-, szövetek károsodásakor felszabaduló anyag) kémiai neve nem nitrogén oxid, hanem nitrogén monoxid (33. o.).

A „paraformaldehyde” kristályos precipitátum, amiből száraz hó hatására metanol- (sav jelenlétében) mentes formalin gáz szabadul fel. Ebből lehet vizes oldatot készíteni – a 4%-os paraformaldehyde megjelölés félrevezető (42. o.). A paraformaldehyde mennyiségét tömeg mértékegységben (g) szokás megadni.

A 3. táblázatban többször szereplő „cytochrome” nyilván gépelési hiba, csakúgy, mint a „FM,/EM” megjelölésben szereplő vessző. Valószínűsítem, hogy a 48. oldalon szereplő 1:18,000 hígítás, ill. az 53. oldalon található 160,000 mm<sup>2</sup> is ebbe a kategóriába tartozik. (NB. A számérték és a mértékegység között leütés helyet kell hagyni! 300 µm, nem 300µm). A 25x nagyítás pontatlan megjelölés, amiből nem derül ki, hogy ez optikai- vagy digitális nagyítás, esetleg ezek együttese. A morphometriai mérések könnyebb technikai megértését jól szolgálta volna egy demonstratív (esetleg sematikus) ábra.

A szerző helytelenül használja az „immunophilin” nevet. A molekuláris biológia *immunophilin* néven említi azokat az endogen, cytosolban található enzimeket, melyek a kémiai szerkezetben *cis-trans* pozíció-konverziót katalizálnak (*isomerázok*). Tehát bármely gyógyszert vagy hatóanyagot, ami az izomeráz-aktivitást befolyásolja (Cyclosporin-A, tacrolimus) *immunophilin-modulátorként* kell szerepeltetni. NB. Az eredeti kifejezésben 1 db l betű szerepel!

## **TARTALMI KÉRDÉSEK:**

### **Irodalmi áttekintés**

A 300 referencia tanúsítja, hogy az értekezés széleskörű irodalmi adatbázisra támaszkodik. Hiányolható viszont, hogy a sejthalál formák bemutatása csak a necrosis vs. apoptosissal kapcsolatos kérdésre korlátozódik! Az erre vonatkozó irodalmi adatokat ki kell egészíteni az elmúlt években megjelent – sokszor „Review” jellegű – közlemények adataival, melyek már behatóan tárgyalják a *necroptosis*, *anoikis*, *autophagia*, stb. összefüggéseit annak függvényében, amit a ma használt morfológiai módszerekkel ezekről a folyamatokról detektálni tudunk. A sejt-károsodás- és sejthalál így tágított képe megoldást kínál arra a felvetésre, amit a szerző – nagyon bölcsen – a necrosis-apoptosis „végpontok” között húzható elméleti tengelyen feltűnhető átmeneti formákként említ.

**Mi a véleménye a szerzőnek arról, hogy a proteolyticus folyamatok szabályozásában van/lehet-e szerepe az ún. „necroptosis” típusú folyamatoknak?** (*Cell* 135: 1311-1323; 2008. *Nature Rev Mol Cell Biol* doi: 10.1038/nrm2970).

#### Technikai részletek:

1. **Mi indokolta a heparin elhagyását** a perfúziós rögzítő folyadékból? Az irodalomban leginkább elterjedt fixálók (Karnovsky módosított eljárása CNS perfúziós rögzítésére) előtti mosó-keverékek tartalmazzák a véralvadást gátlót, így megakadályozzák a microcirculatio vérrögök okozta elzáródását!
2. A statisztikai leírása igen szűkszavú. Nem derül ki például, hogy a különböző kísérletek során a nem-folyamatos numerikus értékek megjelölésekor **mi szolgált a statisztikai próbában később alkalmazott számérték egységül?** Konkrét példával: az érintett axonok száma vagy focalis axonális elváltozás(ok) jelentik az egységet („unit”) a különböző ANOVA próbákban?

#### Kérdések az eredményekkel és azok értelmezésével kapcsolatban:

1. Ismertek arra vonatkozó adatok, hogy az alkalmazott szerek intra-cerebroventricularis, bolus injektálása után ezek a molekulák **milyen kinetika szerint oszlanak el** az agyszövetben, ill. annak egyes részeiben?
2. **Mivel magyarázható**, hogy a DAI kialakulásának sebessége (időbeli elhúzódnása) „**species-függő**”? Úgy tűnik, hogy ugyanazon fajon belül is sajátos a károsodott axonok számának időbeli változása: 15 és 30 perc között nincs jelentős változás, utána következik egy ugrás-szerű növekedés, majd 60-120 perc között ismét minimális az emelkedés (L. 6. ábra; 59. o.). **Lehet ennek a jelenségnek terápiás következménye** – feltéve, hogy hasonló a helyzet emberben is?
3. Ismert adat arra vonatkozóan, hogy a **retrográd axonális transport zavara** szerephez jut-e a soma és soma-közeli struktúrák adaptív/regresszív elváltozásaiban?
4. Milyen lehetőséget lát a szerző arra, hogy a magyar neurotraumatológiai betegellátásban elfogadják és átvegyék a munkacsoportja által megteremtett adatbázis-tükrözte szemléletet? Más szóval: „**Quo vadis**” magyar neurotraumatológia?

## **ÖSSZEFOGLALVA:**

Dr. Büki András MTA Doktori fokozat elnyerése céljából benyújtott értekezése megfelel az MTA Doktori Szabályzatában megfogalmazott követelményeknek. A munka jelentős, nemzetközileg is elismert szakmai tevékenységen alapszik, számos új megfigyelést tartalmaz. Ezek az alapkutatás- és a klinikai kutatás területét egyaránt érintik. Bírálóként meggyőződésem arról, hogy a jelölt a PhD fokozatának elnyerése óta kiemelkedően fontos eredeti tudományos megfigyeléseket tett, amivel hozzájárult az idegtudományok továbbfejlődéséhez. Külön érdeme, hogy a hazai neurotraumatológia kísérletes vizsgálatának területén úttörő szerepet játszott/játszik; nemzetközileg elismert kutatócsoportot szervezett és példát teremtett arra, miként fejleszthető a magyar klinikai neurotraumatológia.

**Mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsájtását, az értekezés elfogadását, ill. Dr. Büki Andrásnak az MTA Doktora cím odaítélését!**

Debrecen, 2012. február 01.

Dr. Molnár Péter  
Egyetemi tanár, az MTA Doktora  
med/Habil Prof. Pathologia és  
Neuropathologia  
DE-OEC, Pathologiai Intézet  
Nagyerdei krt. 98.  
4032