

Válasz Professor Dr. Molnár Péter, az MTA doktorának opponensi véleményére

Elöljáróban szeretném megköszönni Molnár Péter Professor Úrnak, az MTA doktorának, hogy MTA doktori disszertációm bírálatát elvállalta.

Külön köszönöm támogató, kritikus észrevételeit, amellyel az eddigi-, és meglátásom szerint jövőbeli kutató tevékenységemet is jobbítóan befolyásolta.

Bírálatával kapcsolatban az alábbiakat válaszolom:

Formai megjegyzések:

Professor Úr számos olyan *formai kifogást* említ, amelyekkel sajnos csak egyetérteni tudok, hiszen valóban találhatók *szerkesztési hibák* a dolgozatban, mint a bekezdések véletlenszerű használata, illetve, hogy a bekezdések alkalmazása az értelmezést nem minden esetben segíti.

Hasonló módon *az írásjelek használatakor* elkövetett hibákért is csak elnézést tudok kérni, ugyanez vonatkozik olyan elírásokra, mint a craniometriás pontok nagybetűvel írása, illetve az elektronmikroszkópia írás módja. A kompakció kifejezést, elsősorban az angollal konzisztens rövidítés megtartására választottam szemben a tömörülés, tömörítés kifejezéssel, illetve azért, mert - bár nyilván ez is elítélhető – magyar nyelvű közleményekben ugyan ezt a nevezéktant használtuk.

A jövőben szintén igyekszem figyelembe venni, a nitrogén monoxid pontos megnevezésének alkalmazását, illetve a paraformaldehide 4 %-os oldatának precíz írásmódját, illetve a hígítási-, és terület megjelölési pontatlanságokra vonatkozó megjegyzéseket is.

Azokat a formai hibákat, amelyek a disszertáció értékelését nehezíthetik, mint a nyilak, nagyítások hiánya, a bírált minőségű ábrák, az előadásban igyekszem megfelelő felbontásban és módon vetíteni.

Tartalmi kérdések:

Az első kérdés a necroptosis, apoptosis és autophagia kérdéskörére vonatkozik, illetve arra, hogy ezek részletesebb elemzése-, az eredmények e sejthalál formák tükrében történő megjelenítése a dolgozatban nem szerepel.

A fentiekkel kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy mint a Professor úr által hivatkozott publikációk történeti bevezetéséből is kivehető, a disszertáció releváns fejezete alapjául szolgáló publikációk közlésekor, azaz a calpain-, és caspase- mediált axonkárosodás folyamatának leírásakor még a necrosis, illetve apoptosis közti continuum, illetve a necroptosis jelensége korántsem volt ismert, sőt, még a disszertáció megírásakor is csak kevésbé árnyalt képünk volt a fenti jelenségek kapcsolatáról. Maga a necroptosis fogalma csak 2005-ben került bevezetésre és vizsgálatának kísérletes modelljeit is mindössze 4 évvel ezelőtt írták le.

Ami az általunk leírt és elemzett jelenségek és a necroptosis közvetlen viszonyát illeti, a caspase aktiválódás, az apoptoticus enzim-folyamatok indukciója nem jellemző a necroptosisban, illetve a programozott necroptosis elsősorban külső szignálokra indul be, leginkább receptor-mediálta-, éppen ezért programozott folyamat, és gyakran, például a PARP-aktiválódás jelenségénél komoly szerepet játszik benne a transzkripciós gépezet

bevonása is. A necroptosis az apoptotikus kaszkád gátlásakor (kísérletes viszonyok közt ZVAD-fmk-val /pan-caspase-inhibitor/) vagy veleszületett hiányakor (daganatsejtek esetében hiányzó apaptotikus sejthalál-utak) játszik elsődleges szerepet. Ugyanakkor az axonokban létrejövő károsodás inkább egy alapvetően klasszikus necroticus-illetve kisebb mértékben necroticus-apoptotikus enzim kaszkád közti kölcsönhatás eredménye, ahol –a jelenség neuronon belüli lokalizációját is figyelembe véve- a fehérje szintézis illetve az apoptotikusból nekrotikusba váltó halálút valószínűleg kevésbé fontos szerepet játszik.

Technikai részletekre vonatkozó kérdések:

1. A heparin elhagyása nem metodikai koncepció alapján történt, egész egyszerűen azokban az immunhisztokémiával foglalkozó intézményekben, ahol munkámat végeztem, így diákkörösként a POTE Anatómiai Intézetben, melyet joggal mondhatunk az immunhisztokémia egyik hazai bölcsőjének, Merchenthaler István Doktor téma-vezetésével, majd a későbbiekben Richmond-ban a Neurobiológiai Intézetben, a heparint az immunhisztokémiai fixáló eljárások során nem alkalmaztuk, sem a Zamboni féle fixáló kombinációban, sem a rutin szerűen fénymikroszkópos immunhisztokémiára használt 4 %-os paraformaldehyde oldat esetében.

Az Idegsebészeti Klinika Gallyas Professzor Úr vezette Neuropathológiai Laboratóriumában is kizárólag a Karnovsky oldat „receptjében” szerepelt heparin. Tekintettel arra, hogy a megfelelő nyomású fiziológiás átmosó oldatokat alkalmazó perfúziós kezelés után –vér-hígító alkalmazása nélkül is- csupán elenyésző számban találtunk zavaró vérrög-jeleket és vérröggképződést, ezért nem is kényszerültünk olyan technikai hiba- megoldó algoritmus alkalmazására, amely a heparin bevezetését magában foglalta volna.

A heparin egyébként tudomásom szerint elsősorban azokban a laboratóriumokban kihagyhatatlan alkotója a szövetrögztítő oldatoknak, ahol in situ hibridizációs vizsgálatokat is végeznek, ugyanis e vizsgálatok során a heparin antioxidáns, RNS-protéktív hatását is igyekeznek kihasználni.

2. A statisztikai analízis leírására vonatkozóan, a nem folyamatos, numerikus értékek esetében professzor úr kérdése arra irányul, hogy mi szolgált a statisztikai próbában később alkalmazott számérték egységéül?

Kérdésével Professzor úr rendkívül fontos elvi sztereológiai problémára világít rá, ugyanis elméletben egyazon immunreaktív és/vagy károsodott axon több metszetben vagy egy metszet több pontján is megjelenhet, mindez befolyásolhatja a statisztika validálását és az észlelt értékeket „robosztusabbnak” mutathatja a valóságosnál.

A fentiek lehetőség szerinti elkerülésére a számításra kerülő axonprofilok átmérőjét meghatározó kizárási küszöböt alkalmaztunk, azaz csak 5 mikrométer átmérőnél kiterjedtebb immun reaktív axon szegmenseket számoltunk a kvantitativ vizsgálatok során. Ezzel a módszertannal álláspontunk szerint, ha nem is teljesen, de sikerülhetett elkerülni az „egy axon többszöri számolásának” problémáját, illetve standardizálni/minimalizálni azt.

Az eredményeket egy kísérleti állat esetében egy négyzetmilliméterre számított immunreaktív axonszegmensek számában adtuk meg, azaz az axon-denzitás mértékegysége a darab(„unit”)/négyzetmilliméter volt.

Az eredményekkel és azok értelmezésével kapcsolatos kérdések:

1., Az alkalmazott szerek intracerebro-ventriculáris bólus injektlása után történő eloszlására vonatkozó kinetikai megfigyelések mind a jelölő anyagok, mind a neuroprotektív szerek

esetében limitáltak. Pontosan ez indokolta a PACAP és a PARP- inhibitor esetében a dózis - hatás vizsgálatok kivitelezését (Farkas et al., 2004;Kovesdi et al., 2010), illetve minden vizsgálat esetében a kontroll csoportok –beleértve az immunhisztokémiai kontrollokat is- megfelelő megválasztását.

A HRP megoszlására vonatkozóan történtek empirikus megfigyelések a richmondi neurobiológiai laboratóriumban, Pettus és Povlishock részéről, melyeket részben a vonatkozó publikációk is tartalmaznak (Pettus et al., 1994;Povlishock et al., 1996). E vizsgálatok szerint a jelölőanyag az extracerebrális térben eloszlik és 2 óras eloszlási ideje alatt ép ultrastruktúrájú és membránszerkezetű axonokban nem jelenik meg. Ez a diffúzió saját vizsgálataink szerint is minden kísérleti állat és kísérleti beállítás esetében az azonos túlélési idők mellett jól reprodukálhatóan történt.

2., A DAI kialakulás kinetikájával, annak species-specifikusságával kapcsolatban csak részleges ismereteink vannak.

Az egyazon fajon belül a károsodott axonok számának időbeli változására vonatkozó megfigyelésekre két elvi magyarázat adható.

Az első egész egyszerűen az immunhisztokémiai reakció propagációjára vonatkozik, azaz a kórfolyamat előrehaladásával, például a calpain-mediált lebontási termékek felszaporodása következtében egyre több axonban éri el a metodika érzékenysége szintjét - azaz válik detektálhatóvá - a fehérje lebontási termék mennyisége.

A második, inkább a kórfolyamat lényegére utaló magyarázat, hogy a calpain mediált spektrin lebontás következtében kialakuló másodlagos mintochondriális károsodás, az axonális energiaháztartás összeomlása a calpain mediált axonális permeabilitási zavar fokozatos progressiójához vezet, és ezzel idézi elő az immunhisztokémiai reakcióknak a fenti idő tengely mentén észlelt propagációját.

A fajok közötti különbség, a reakció sebesség eltéréseinek okát nem ismerjük és bár ésszerű azt feltételezni, hogy ebben szerepe lehet a humán viszonyok közt gondosabban elkerült másodlagos károsodásoknak, a termikus ingadozások csökkentésére való törekvéseknek, a realitás az, hogy az állatkísérletek olyan kontrollált formában folynak, ahol a másodlagos károsodások és a hyperthermia sokkal inkább elkerülhetők, mint a klinikai viszonyok között. Talán a lysencephalicus rágcsálóagy és a fejlettebb szerkezetű, komplexebb magasabb rendű agy szerkezetében-, azaz a gél struktúrában, a fizikai kompenzációs mechanizmusok eltérő voltában kereshető az a fajta különbség, amely a magasabb rendű élőlények esetében a patológiás változások lassúbb progressiójához vezet.

Azok a vizsgálatok, amelyek több laboratóriumban, többek közt a Richmondi Kutató Intézetben is ezt a kérdést célozták, arra mutatnak, hogy a primatesekben lassabban progredialó patológiás folyamatok feltétlenül a terápiás ablak kihasználásának lehetőségével kecsegtethetnek és ezt a megfigyelést érdemes a klinikai gyógyszerkipróbálások tervezésekor is figyelembe venni (Sherriff et al., 1994a;Sherriff et al., 1994b;Wilkinson et al., 1999).

3., A retrográd axonális transport zavar és a soma/soma közeli struktúrák adaptív regresszív elváltozásaival kapcsolatban rendkívül sok a nyitott kérdés, ugyanakkor ismert az a klasszikus tanítások alapján talán részben meglepő jelenség, hogy a diffúz axonkárosodás vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott kísérletes modellekben az axonok sérülése nem jár feltétlenül a soma irreverzibilis károsodásával (Lifshitz et al., 2007).

Greer és munkatársai vizsgálatai szerint egér folyadék percussios koponyatrauma modellben a cortex V-ös rétegében perisomaticus elhelyezkedésben károsodást szenvedett axonok fluoreszcens követése és kettős jelölési vizsgálatok alapján a tengelyfonalához tartozó neuronok 4 hét alatt sem mutatnak pusztulást, hanem zsugorodott alakot öltenek, s a sejttest atrophiával egyidejűleg az axonális regeneráció genetikai programjának indukciója (c-

jun, ATF-3) zajlik bennük, következményes axon-regenerációval és perifériás axonális reorganizációval (Greer et al., 2011).

Kelley és munkatársai ugyanakkor a dorsolateralis s a ventralis posterior thalamus magban a perisomaticus axonsérülés hatására már 30 percen belül axotomia jeleit találták, 3 óra múlva pedig kiterjedt Waller féle degenerációt írtak le az agytörzsben (Kelley et al., 2006).

Valószínűsíthető, hogy az axono-somaticus károsodás illetve túlélés jelensége a kiváltó trauma minőségétől, a másodlagos károsodások mértékétől (hypoxiás környezet, ATP rendelkezésre állása) illetve a károsodás sejttesttől mért távolságától, valamint az érintett axon vastagságától és típusától is függ (Farkas et al., 2007).

4. Quo vadis magyar neurotraumatológia?

Amikor az évtized elején Csepregi Doktorral, az Országos Baleseti Intézet anaesthesiológus és intenzív therapiás főorvosával, és több más lelkes, a neurotraumatológia területén dolgozó intenzív-terapeuta és idegsebész kollegával az országos prospektív felmérésen dolgoztunk, majd annak következtetéseit is figyelembe véve az idegsebészeti szakmai kollégium megalkotta a súlyos koponyasérültek ellátására vonatkozó irányelveket, reméltük, hogy tevékenységünk, az ellátási irányelvek terjesztése a tucatjával rendezett ismeretterjesztő és postgraduláris képző fórumokon és előadásokon érdemi változást hoz a súlyos koponyasérültek ellátásában.

Sajnálatos módon a 2002-es felmérés kiábrándító eredményei, a nemzetközi ellátás irányelvek alkalmazásával való mindössze 20 %-os komplálás és az Európában elvárható halálozás, több mint kétszerese, az évi közel 700 feleslegesen elvesztett fiatal munkaképes élet ténye nem alarmizálta sem a biztosítót, sem az egészségügyi kormányzatokat és sajnos nem vezetett a sérülteket ellátó orvos-csoportok attitűd-változásához sem.

A 2007. és 2011. közötti OEP adatok folyamatban lévő feldolgozása alapján, melyet Sándor János docens úrral, a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Kar Megelőző Orvostani Intézet Biostatistikai és Epidemiológiai Tanszékének vezetőjével végzünk, megállapítható, hogy a fenti időszakban Magyarországon minden második beteg, aki bármilyen súlyosságú koponyatrauma miatt műtéti kezelésem esett át, fél éven belül halott. Csak összehasonlításképpen, az ausztrál DECRA tanulmányban egy éve között, legsúlyosabb állapotú diffúz agysérülteknél ez az arány 19%.

Az ellátási irányelvek implementálása Hazánkban annak ellenére nem történik meg, hogy azok több bizonyíték szerint szignifikánsan növelik a túlélési esélyeket, míg az ellátási irányelvektől tartósan eltérő magatartás és az ellátás irregularitása, inekvalitása szignifikánsan rontja a kimeneti esélyeket (Vukic et al., 1999) (Sandor et al., 2003).

Ugyanakkor nemcsak magyar problémáról van szó. Holland vizsgálatok szerint a Nyugat-Európai országokban 3,3-szoros a legjobb és a legrosszabb kimenetelt produkáló neurotrauma intézet ellátási minősége közti eredmény-különbség, míg ugyanez cardialis betegségek ellátásánál mindössze 1,2-1,4-nek adódik. Ez azt jelenti, hogy ha minden beteget olyan minőségű ellátásban részesítenének, mint Hollandiában, akkor évente 100 ezer emberi életet lehetne megmenteni Európában (Andrew Maas, Hester Lingsma, személyes közlés, eredmények részben közölve: (Lingsma et al., 2011)).

A kérdésre adott rövid válaszom: az ellátási irányelvek betartatása, az ellátás auditálása, a biztosító költséghatékony, racionális fellépése, kontroll-szerepe nélkül Hazánkban nem lesz változás az ellátásban; Magyarországon nem elsősorban kutatási, hanem egészségügyi rendszerszervezési probléma a neurotraumatológiai ellátás ügye.

A bírálatra adott válasz zárásául, ismételten megköszönöm Professzor Úrnak jobbító szándékú kritikai észrevételeit és tisztelettel kérem, hogy válaszaimat elfogadni szíveskedjen.

Őszinte nagyrabecsüléssel,

dr.Büki András

Pécs, 2012. március 01.

Irodalom

- FARKAS,O. and POVLISHOCK,J.T. (2007). Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Prog. Brain Res.* **161**, 43-59.
- FARKAS,O., TAMAS,A., ZSOMBOK,A., et al. (2004). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul. Pept.* **123**, 69-75.
- GREER,J.E., MCGINN,M.J., and POVLISHOCK,J.T. (2011). Diffuse traumatic axonal injury in the mouse induces atrophy, c-Jun activation, and axonal outgrowth in the axotomized neuronal population. *J. Neurosci.* **31**, 5089-5105.
- KELLEY,B.J., FARKAS,O., LIFSHITZ,J., and POVLISHOCK,J.T. (2006). Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and Wallerian degeneration. *Exp. Neurol.* **198**, 350-360.
- KOVESDI,E., BUKOVICS,P., BESSON,V., et al. (2010). A novel PARP inhibitor L-2286 in a rat model of impact acceleration head injury: An immunohistochemical and behavioral study. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1253-1268.
- LIFSHITZ,J., KELLEY,B.J., and POVLISHOCK,J.T. (2007). Perisomatic thalamic axotomy after diffuse traumatic brain injury is associated with atrophy rather than cell death. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 218-229.
- LINGSMA,H.F., ROOZENBEEK,B., LI,B., et al. (2011). Large between-center differences in outcome after moderate and severe traumatic brain injury in the international mission on prognosis and clinical trial design in traumatic brain injury (IMPACT) study. *Neurosurgery* **68**, 601-607.
- PETTUS,E.H., CHRISTMAN,C.W., GIEBEL,M.L., and POVLISHOCK,J.T. (1994). Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. *J. Neurotrauma* **11**, 507-522.
- POVLISHOCK,J.T. and PETTUS,E.H. (1996). Traumatically induced axonal damage: evidence for enduring changes in axolemmal permeability with associated cytoskeletal change. *Acta Neurochir. Suppl* **66**, 81-86.
- SANDOR,J., SZUCS,M., KISS,I., et al. (2003). [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage]. *Ideggyogy. Sz* **56**, 386-395.
- SHERRIFF,F.E., BRIDGES,L.R., GENTLEMAN,S.M., SIVALOGANATHAN,S., and WILSON,S. (1994a). Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol.* **88**, 433-439.
- SHERRIFF,F.E., BRIDGES,L.R., and SIVALOGANATHAN,S. (1994b). Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol. (Berl)* **87**, 55-62.
- VUKIC,M., NEGOVETIC,L., KOVAC,D., GHAJAR,J., GLAVIC,Z., and GOPCEVIC,A. (1999). The effect of implementation of guidelines for the management of severe head injury on patient treatment and outcome. *Acta Neurochir. (Wien.)* **141**, 1203-1208.
- WILKINSON,A.E., BRIDGES,L.R., and SIVALOGANATHAN,S. (1999). Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol. (Berl)* **98**, 197-202.