MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

FEHÉRJEBONTÓ FOLYAMATOK DIFFÚZ AGYSÉRÜLÉSBEN: KÍSÉRLETES VIZSGÁLATOKTÓL A KLINIKAI FELHASZNÁLÁSIG

Büki András Zoltán



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR IDEGSEBÉSZETI KLINIKA PÉCS, 2010

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 tanáraim, 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 Pörczi 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 Úré, 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 Reglődi 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.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
BEVEZETÉS	9
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
1.1. Súlyos koponyasérülés –epidemiológiai adatok	11
1.2. A koponya/agysérülések osztályozása	12
1.2.1. Osztályozás az intracranialis fertőzés valószínűsége alapján	
1.2.2. Patoanatómiai felosztás	12
1.2.3. Patobiológiai felosztás	12
1.2.4. A sérülés súlyosságán alapuló felosztás	
1.3. Diffúz agysérülés- Diffúz axonkárosodás	14
1.3.1. Az axonduzzadás/axonballon-képződés jelensége	
1.3.2. Az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (UC, NFC)	
1.4. Kálcium indukálta fehérjebontó folyamatok szerepe az axonkáro	osodásban20
1.5. Periszomatikus axonkárosodás és diffúz neuronális károsodás	22
1.6. Mitochondriális károsodás diffúz axonkárosodásban: apoptotiku	15
folyamatok aktiválódásának elvi alapjai	23
1.7. Diffúz agysérüléshez társuló gerincvelő károsodás	
1.8. Prognosztikai faktorok, biomarkerek szerepe a súlyos koponyasé	érültek
ellátásában	27
1.8.1. Spectrin és lebontási termékei	
1.8.2. Prognosztikai modellek	29
1.9. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgála	atok30
1.9.1. A mitochondriumok integritása és az axonális energia-háztartás	megőrzése 31
1.9.2. A calpain gátlása	
1.9.3. Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polypeptid	
(PACAP) alkalmazása	
1.9.4. A PARP-gátlás	
2. CÉLKITŰZÉSEK	
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZER	
3.1. Kísérleti állatok	

3.2. Állatkísérletek: műtéti technikák, kísérletes koponyatrauma-modellek	38
3.2.1. Kisállat-narcosis	38
3.2.2. Az élettani paraméterek monitorozása	38
3.2.3. Impakt-akcelerációs koponyatrauma	39
3.2.4. Centrális folyadék-perkussziós koponyatrauma	40
3.2.5. Tormagyökér-peroxidáz alkalmazása	41
3.3. Kísérletes terápiás vizsgálatok	41
3.3.1. Az MDL-28170 adagolása	41
3.3.2. A PACAP adagolása	41
3.3.3. Az L-2286 PARP-inhibitor adagolása	42
3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	42
3.4.1. Perfúziós fixálás	42
3.4.2. Az agytörzs feldolgozása	43
3.4.3. Immunhisztokémiai jelfelerősítés –"antigene retrieval"	43
3.4.4. Antiszérumok jellemzése	43
3.4.5. Szövettani metszetek előkészítése fény- és elektronmikroszkópos	
immunhisztokémiára	46
3.5. Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelölési stratégia	46
3.5.1. Immun-elektronmikroszkópiai szövetfeldolgozás	48
3.6. Speciális kettősjelölési metodika – Tyramide jelfelerősítés (TSA)	48
3.6.1. Immunfluoreszcencia EM-ra konvertálása TSA-val	48
3.6.2. Ultrastrukturális vizsgálatok	49
3.7. Immunfluorescens kettős jelölési technikák	50
3.7.1. IHC kontrollok	51
3.8. Hisztokémia: HRP-kimutatás	51
3.9. Az eredmények feldolgozása	51
3.9. Az eredmények feldolgozása	51 51
 3.9. Az eredmények feldolgozása	51 51 52
 3.9. Az eredmények feldolgozása 3.9.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka 3.9.2. Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika 3.9.3. Statisztikai módszerek. 	51 51 52 52
 3.9. Az eredmények feldolgozása 3.9.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka 3.9.2. Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika 3.9.3. Statisztikai módszerek. 3.10. Viselkedésvizsgálatok. 	51 51 52 52 53
 3.9. Az eredmények feldolgozása 3.9.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka 3.9.2. Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika 3.9.3. Statisztikai módszerek. 3.10. Viselkedésvizsgálatok 3.10.1. Egyensúlyozás-teszt. 	51 51 52 52 53 53
 3.9. Az eredmények feldolgozása 3.9.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka 3.9.2. Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika 3.9.3. Statisztikai módszerek. 3.10. Viselkedésvizsgálatok 3.10.1. Egyensúlyozás-teszt. 3.10.2. Emelt keresztpalló teszt. 	51 51 52 52 53 53 54

3.11. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis Feldolgozása55
3.11.1. Liquorminták elemzése56
3.11.2. Prognosztikai vizsgálatok57
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS
I. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó
folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kóreredetében I58
i., a calpain aktiválódásának és az axonkárosodás klasszikus markereinek
viszonya- illetve a spectrin-lebontás tér-és időbeli alakulásának vizsgálata58
Következtetések
ii., Fény-és elektronmikroszkópos kettős-jelöléses vizsgálatok egyszerűsítésére
szolgáló immunhisztokémiai eljárás kidolgozása az axonkárosodás
kórfolyamatainak vizsgálatára63
Következtetések
II. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó
folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kóreredetében II. A diffúz
axon-sérülés során létrejövő mitochondriális károsodás és az apoptoticus
folyamatokban szerepet játszó cisztein proteáz-kaszkád (caspase)
következményes aktiválódásának vizsgálata66
i. Fénymikroszkópos, kvalitatív immunhisztokémiai megfigyelések66
ii. Fénymikroszkópos, kvantitatív immunhisztokémiai megfigyelések67
iii. Ultrastrukturális vizsgálatok68
iv. Kettős jelöléses immunfluorescens vizsgálatok69
Következtetések70
III. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata – Diffúz
agysérüléshez társuló gerincvelői axonkárosodás71
i., A diffúz axonális károsodás mértéke és az azt kiváltó energia
összefüggésének leírása71
ii., Az akcelerációs - decelerációs mechanizmussal kialakuló koponya/
agysérüléshez társuló, távoli (gerincvelői) diffúz axonális károsodás
jelenségének igazolása72
Következtetések74
IV. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis feldolgozása
i. Fehérjebontó folyamatok kimutatása koponyasérültekben: alkalmazott
klinikai kutatások - A diffúz agysérülés során aktiválódó fehérjebontó

folyamatok azonosítása súlyos koponyasérültek agyvíz mintáinak elemzésével.76
Következtetések
ii. Prognosztikai faktorok azonosítása súlyos koponya-agysérültek
ellátása során
Következtetések
V. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása I.: fehérjebontó
folyamatok gátlásának vizsgálata83
i., A szelektív calpain- inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális
károsodást jelző immunhisztokémiai markerek vizsgálata83
Következtetések
ii., A szelektív calpain- inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális
membrán-permeabilitási zavar gátlásának vizsgálata84
Következtetések
VI. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása II.: a
nekrotikus és apoptoticus folyamatokat gátló pituitary adenylate cyclase
activating polypeptide (PACAP) hatásának vizsgálata87
i., A PACAP diffúz axonális károsodást befolyásoló képességének felmérése:
trauma előtt adott polypeptide hatásának elemzése, dózis-hatás-görbe
felállítása87
ii., A PACAP diffúz axonális károsodást befolyásoló képességének további
vizsgálata: a terápiás ablak meghatározása89
iii., A PACAP axonoprotektív hatásának vizsgálata a diffúz axonális
károsodás további állatkísérletes modelljén: a centrális folyadék perkussziós
modell elemzése90
Következtetések91
VII. A diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása III.: az
apoptoticus folyamatokat gátló PARP-inhibitor L-2286 hatásának elemzése93
Következtetések96
5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉG98
6. KÖZLEMÉNYEK104
7. IRODALOM

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)
СТ	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 (hearth rate)
IA	impakt akcelerációs (-koponyasérülési modell)
IAT	axonális transzport-zavar (impaired axonal transport)
ICP	intracraniális nyomás (intracranial pressure)
icv	intracerebroventrikuláris
IHC	immunhisztokémia(-i)
IR	immunreaktív
iv	intravénás

IVV	intraventriculáris vérzés
KIR	központi idegrendszer
LM	lemniscus mediális
MABP	artériás középnyomás (mean arterial blood pressure)
MLF	mediális hosszanti köteg (medial longitudinal fascicle)
MPT	mitochondriális permeabilitási átmenet (mithochondrial permeability
	transition)
MR(I)	mágneses magrezonancia (-képalkotás)
NF	neurofilament
NDS	normál szamár szérum (normal donkey szérum)
NFC	neurofilament kompakció (neurofilament compaction)
NGS	normál kecske szérum (normal goat szérum)
NHS	normál ló szérum (normal horse szérum)
NIH	National Institute of Health
ns	nem szignifikáns
PA	poszttraumás amnesia
PACAP	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (pituitary adenylate cyclase
	activating polypeptide)
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 (traumatic axonal injury; a DAI állatkísérletes
	megfelelője)
TNF	tumor nekrózis faktor
TSA	tyramide-jelfelerősítés (tyramide signal amplification)
UC	ultrastrukturális kompakció (ultrastructural compaction)
VVIP	Vector VIP-festékanyag
WHO	Egészségügyi Világszervezet

BEVEZETÉS

Az első négy életévtizedben súlyos koponyasérülésben hal meg a legtöbb ember. Tíz éven belül várhatóan az egész világon ez lesz a három leggyakoribb halálok egyike, ugyanakkor a közvélemény, sőt, az egészségügyi ellátó rendszerek sem vesznek kellő tudomást a kórkép jelentőségéről; nem véletlen a baljós hangzatú elnevezés: "the silent epidemic", azaz "a csöndes járvány".

A sérültek általában az aktív populációból kikerülő, munkaképes fiatalok, akiknek halála nemcsak családjukra, hanem a társadalom egészére is óriási terhet ró. Az Egyesült Államokból (USA) származó adatok szerint egy évben közel 50 milliárd USA dollárt tesznek ki a koponyasérültek ellátására fordított közvetett és közvetlen költségek, többet, mint az űrkutatási hivatal /"NASA"/ teljes évi költségvetése. A fiatal életek megmentésével megőrzött munkaképes évek ugyanakkor jól magyarázzák, miért számít a súlyos koponyasérültek korszerű ellátása az egyik leg-költséghatékonyabb orvosi tevékenységnek.

E disszertáció szerzője 1997-ben ösztöndíjasként került a richmondi egyetemre, a diffúz agysérülés kutatásának akkori központjába, a koponyasérültek ellátására vonatkozó irányelvek születésének egyik helyszínére. Itt szembesült azzal, hogyan alakíthatja át az orvosi döntéshozatalt a patofiziológiai megközelítés és a tudományos bizonyítékokon alapuló orvoslás elveinek következetes alkalmazása.

Hazatérve még nyilvánvalóbbá vált számára az ellentét az akut súlyos agysérülés reménytelensége és a terápiás eszköztár illetve döntések korlátozottsága közt. E helyzetben nem volt más választása, mint legjobb tudása szerint munkálkodni e korlátok áttörésén. Jelen disszertáció természeténél fogva csak szűk területéről szól annak a tíz éves munkának, melynek eredményeként Kelet Európában elsőként, akkreditált neurotraumatológiai kísérletes modelleket és a fiziológiai paraméterek monitorozását bevezetve, sikerült apró, de lényeges kérdések megválaszolásával hozzájárulni a dollár milliókból működő nagy kutatóközpontok eredményeihez. Eközben hosszabb-rövidebb tanulmányútra 4 munkatárs került ki az Egyesült Államokba, közülük ketten dolgoznak ismét Magyarországon. A laboratórium hazai, ETT és OTKA források mellett NIH-Fogarty támogatást kapott.

Amiről a dolgozat természeténél fogva alig tehet említést, az a súlyos koponyasérültek ellátásának megreformálására tett erőfeszítések. Szerző és néhány elhivatott munkatársa elsőként szembesítette a döntéshozókat és az ellátókat a honi koponyasérült-ellátás katasztrofális eredményeivel és körülményeivel. A munkacsoport Markusovszky emléklapot kapott, az idegsebészeti szakmai kollégium pedig az eredmények alapján dolgozhatta ki a hazai ellátási irányelveket. E tevékenységnek alig van tudomány-mérési módszerekkel

kifejezhető, "peer reviewed" közlésre méltó eredménye: közel 30 továbbképző előadás, a prehospitális irányelvek fordítása és közzététele, a kórházi ellátási irányelvek szerkesztése, ellátás-auditálási programok szervezése, a magyarországi ATLS-képzésben egyedüli idegsebészként történő részvétel és az egyetlen hazai neurotraumatológiai, immár több mint 350 súlyos koponyasérült adatait magában foglaló adatbank és után-követési rendszer képezi fő állomásait.

A módszeresen épített külkapcsolatok nemcsak az alapító társszervezőként jegyzett eddigi öt Pannon Symposiumban, vagy az USA Védelmi Minisztérium kutatási támogatásában gyümölcsöztek, de elsőként Hazánkban az agyszöveti oxigenizáció és hőmérséklet, valamint a keringés mérésére szolgáló monitorok rendszeres alkalmazásának alapjait is sikerült megteremteni (Licox és Hemedex); a COSBID programban a koponyasérültek csík-elektródos EEG monitorozásának kutatási programjához is csatlakozott a munkacsoport.

Patetikus kérdés, hogy ment-e a fenti tevékenység eredményeként a koponyasérültek ellátása előbbre Magyarországon? Annyi bizonyos, hogy a tudományos bizonyítékon alapuló irányelvek alkalmazása hosszútávon megkerülhetetlen eleme lett az ellátásnak. Az ellátás racionális szervezése és az irányelvek bevezetése megfelezte a súlyos koponyasérültek nyugati országokban mért morbiditását és mortalitását; a kutatókon a sor, hogy a maradék 15-20% mortalitást csökkentsék. A Hazánkban még mindig 50% feletti mortalitás leszorítása az idegsebész klinikus-kutató egyik fő feladata, mindemellett megkerülhetetlen az alapkutatási vizsgálatokban történő részvétel is.

A már említett, richmondi vizsgálatok a diffúz agykárosodás különböző formái közül klinikai és epidemiológiai jelentősége okán kiemelkedő diffúz axonális károsodás kóreredetének feltárására koncentráltak s e munka folytatódott a pécsi laboratóriumban. A disszertációban összefoglalt kutatások célja a diffúz axonális károsodás kialakulását előidéző fehérjebontó folyamatok, a "nekrotikus" illetve "apoptoticus" kaszkád szerepének azonosítása illetve az azt befolyásoló kísérletes terápiás modalitások vizsgálata. A súlyos koponyasérültek sürgősségi - és intenzív terápiájában résztvevő idegsebészként a szerző célja továbbá az alapkutatási vizsgálatok eredményeként azonosított fehérjebontó folyamatok "tettenérése" a sérült emberi agyban illetve klinikai diagnosztikai – neuro-monitorozási felhasználásuk megalapozása abban a reményben, hogy a fehérjebontó folyamatok követése segítheti a terápia hatékonyságának megítélését, a prognózis becslését és a kezelés individualizálását.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Súlyos koponyasérülés –epidemiológiai adatok

A globális fejlődés eredményeként elterjedő motorizáció arányával párhuzamosan, folyamatosan emelkedik a baleset okozta agysérülés előfordulása, mely a fejlett ipari országok 40 év alatti lakossága körében a vezető halálokot képezi. A WHO felmérései szerint 10 millió baleseti agysérülésből bekövetkező haláleset, vagy kórházi ápolás történik világszerte minden évben; a világon 57 millió ember szenvedett élete során legalább egyszer traumás agysérülést, s a kórkép 2020-ra várhatóan a világon a harmadik leggyakoribb halálok lesz^{128, 170}. A National Institute of Health (NIH) felmérése szerint az Amerikai Egyesült Államokban (USA) 1.4 millió baleseti agysérülés történik évente, melyből 50 000 halálos kimenetelű, 235 000 igényel kórházi kezelést, és 5.3 millió ember él koponyasérülésre visszavezethető tartós egészségkárosodással¹²⁸. Követéses vizsgálatok igazolták, hogy a baleset után 1-3 évvel a normál populációhoz képest a baleseti agysérülést szenvedettek körében csaknem kétszeres esély van alkohol-abúzus kialakulására, míg 11-szeres epilepszia, 7.5-szörös halál, 1.5-szörös depresszió, illetve 2.3-4.5-szörös Alzheimer kór előfordulására^{103, 105, 204}.

Az első hazai epidemiológiai vizsgálat 1997-ben önbevallásos kérdőíves módszerrel készült és évi 2000 súlyos koponyasérültet (a Glasgow Kóma Skála (GCS) érték 9 alatt) valószínűsített, 42%-os halálozással.

Ezen adatbázis eredményeit felhasználva munkacsoportunk 2003-ban a subdurális vérzést szenvedett betegeknél regisztrált a nemzetközi adatokhoz képest közel kétszeres halálozást²³², majd 2007-ben a hat évvel korábbi országos prospektív felmérés megdöbbentő adatait ismertettük, mely szerint a kórházi halálozás a fenti betegcsoportban meghaladja az 54%-ot, amely az évi 14 000-re becsült számú koponyasérült 9%-át kitevő súlyos eseteket tekintve közel 700 halálesetet jelent évente. Ráadásul a túlélők közül az elbocsátáskor 40% tartós vegetatív állapotú, vagy súlyos maradványtüneteket mutat, ami szintén jóval magasabb, mint a nemzetközi irodalomból ismert hasonló adatok. Az akut ellátást túlélőknek csak 45%-a gyógyul enyhe maradványtünetekkel vagy maradványtünetek nélkül. A túlélők hosszú távú életminőségét elemző vizsgálatok folyamatban vannak, de becslések szerint hazánkban közülük csak minden negyedik illeszkedhet vissza a társadalomba⁴⁷.

1.2. A koponya/agysérülések osztályozása

A koponya-agysérülések osztályozása éppen a kórkép összetett volta miatt több szempont szerint történhet, e tudományos igényű összefoglaló műben –annak alkalmazott kutatási jellegű témája miatt is – szerző a klinikai szempontból legrelevánsabb csoportosítást teszi közzé^{28,89}.

1.2.1. Osztályozás az intracraniális fertőzés valószínűsége alapján

A koponyasérülések e klasszikus felosztása, melyben az agyvíz-tér megnyílása, az esetleges agyvízcsorgás (liquorrhoea), és a következményes meningoencephalitis kialakulásának lehetősége alapján *nyílt* és *zárt* sérüléseket különböztethetünk meg az antibiotikumok alkalmazása óta veszített jelentőségéből¹. A nyílt sérülések lehetnek *penetráló*, azaz a koponyacsontot és az agyburkokat átszakító sérülések, illetve az agyvíz-tér és a külvilág *indirekt* közlekedését eredményezők, ha a koponyaalap törése esetén légtartalmú melléküreg nyílik meg (pl. frontobazális törés esetén a sinus frontális, laterobazális törés esetén a dobüreg, a mastoid sejtek).

1.2.2. Patoanatómiai felosztás

A patoanatómiai illetve képalkotó vizsgálatokkal megjeleníthető elváltozások két fő formája a gócos (*fokális*) illetve az ép agyszövetben elszórtan előforduló (*diffúz*) agysérülés, utóbbi képezi ezen értekezés fő témáját. Előbbit elsősorban statikus, vagy egy pontban ható, úgynevezett impakt típusú, míg utóbbit döntően dinamikus, gyorsulásos-lassulásos erőbehatás hozza létre (*1.táblázat*). Mivel a balesetek gyakran a fenti erők együttes jelentkezésével járnak, a két kórforma a sérültek túlnyomó többségében egyidejűleg fordul elő.

A *fokális sérülések* főbb *típusai:* epidurális vérzés, subdurális vérzés, contusiós állományi vérzés, és az azzal járó traumás subarachnoideális vérzés. A *diffúz agysérülés altípusai:* (diffúz) vasculáris sérülés, hypoxiás agysérülés, agyduzzadás, axonális károsodás, neuron károsodás.

1.2.3. Patobiológiai felosztás

A sérült a trauma pillanatában szenvedi el az ún. *elsődleges* agysérülést, melynek mértékét és jellegét csupán a baleset körülményei, a preventíven alkalmazott eszközök, a sérült alkata és helyzete határozza meg, következésképpen e sérüléseket a kezelés nem befolyásolja. A sérülés pillanatától azonnal megkezdődik az ún. *másodlagos* károsodások kialakulása, melyek eredője az agyi hypoxiában és hypoperfusióban, illetve az eredeti károsodás

kiterjedésének növekedésében nyilvánul meg. Tudományos bizonyítékok alapján tudjuk, hogy a (prehospitális) ellátás során észlelt hypoxaemia (90% alatti artériás oxigénsaturatio /SaO₂/) vagy hypotensio (90 Hgmm alatti systolés vérnyomás) szignifikánsan rontja a kimenetelt^{27,43}. a,b

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

1.	táblázat.	Koponya/	agysérülések	felosztása	1
----	-----------	----------	--------------	------------	---

^a Súlyos koponyasérülés, GCS<9

^b A disszertáció szempontjából legrelevánsabb kórképek vastagon szedve

^c Gyakran társul diffúz agyszöveti károsodással

1.2.4. A sérülés súlyosságán alapuló felosztás

Az elmúlt két évtized tudományos publikációi és az azokon alapuló ellátási irányelvek a sérülés súlyosságának megítélését elsősorban a tudatzavar mértékére alapozták; ennek fokmérője a Teasdale és Jennett²⁷² által kidolgozott glasgow-i coma skála (GCS). A GCS értékét az agy megfelelően oxigenizált és vérrel ellátott állapotában kell meghatározni. A skála

pontosságát metabolikus zavarok (pl. hypoglykaemiás coma, alkohol-, drog intoxikáció) nagyban befolyásolják. Mivel a korszerű ellátás a sérült azonnali szedálását és szükség szerint helyszíni intubálását írja elő, a GCS az utóbbi időben jelentősen vesztett értékéből, ráadásul nyilvánvaló, hogy egy adott GCS-érték hátterében számos, teljességgel eltérő jellegű és egészen más kimenetellel jellemezhető elváltozás állhat²²⁶. Mindazonáltal, amíg a sérülést követő első CT-felvételeken alapuló pontrendszerek (Marshall- és Rotterdam- beosztás¹⁰⁸), illetve a vérből meghatározható, a sérülés súlyosságát és a várható kimenetelt jelző biomarkerek széles körben el nem terjednek, a GCS képezi a közeljövő sérült-osztályozásának alapját is. A GCS- érték és klinikai adatok alapján az alábbi sérüléstípusokat különíthetjük el:

- *enyhe sérülés:* az eszméletvesztés időtartama 30 percnél kevesebb, a poszttraumás amnézia (PA) legfeljebb néhány órára terjed ki, és a GCS nem kevesebb, mint 13.
- középsúlyos sérülés: az eszméletvesztés időtartama kevesebb, mint 6 óra, a PA maximum néhány nap, a GCS 9-12 közötti.
- súlyos sérülés: a GCS 9 alatti.

Újabban a GCS 13 fokú sérülteket szokás a közepesen súlyos kategóriába sorolni, ugyanis a GCS 14 és 15 értékkel jellemezhető csoportban a kimenetelt a CT kép határozza meg, míg a GCS 13-11 csoportban a neurológiai állapot romlása, epilepsziás görcsök, illetve a GCS 10-9 csoportban a GCS legjobb motoros válasz-értéke a kimenetel szempontjából döntő tényező⁴⁶.

1.3. Diffúz agysérülés- diffúz axonkárosodás

Mint a fenit szakaszban részleteztük, a baleseti agysérülések osztályozása során fokális és diffúz agysérülést szokás megkülönböztetni, s a két forma társulhat. A diffúz agysérüléseken belül leírt négy klasszikus alcsoport, a diffúz axonális károsodás ("diffuse axonal injury/DAI"), hypoxiás agykárosodás ("hypoxic brain damage"), agyduzzadás ("brain swelling") és a rendkívül korán halálhoz vezető, klinikai relevanciával alig rendelkező diffúz vasculáris sérülés ("diffuse vascular injury") mellett nemrégiben került leírásra a diffúz neuronális károsodás (*1.táblázat*). A kórképek közül klinikai és - éppen ezért – kutatási szempontból a DAI a legnagyobb jelentőségű³. E munka elsődleges tárgya, a DAI típusosan accelerációs-decelerációs mehanizmussal kialakuló, a fehérállományt, azon belül is elsősorban a corpus callosumot valamint a hosszúpályák agytörzsi szakaszát érintő elváltozás^{3,5,44,79,80}. A koponyatrauma hatására létrejövő axonális elváltozások az agy egész állományára kiterjedve, ép axonok között elszórtan figyelhetők meg, egyébként többnyire ép szöveti környezetben. A diffúz agysérülések kialakulásában acceleráció-deceleráció hatására ébredő nyíróerők játszanak szerepet, amelyek tipikusan motorbicikli-, személygépkocsi-, vagy

gázolásos balesetek során fordulnak elő². A kórkép klinikai megjelenésére a tudatzavart magyarázó térfoglaló elváltozás-, vagy metabolikus zavar nélkül fennálló comatosus tudatállapot a jellemző^{78,79}. A CT-n csak kb. 20 %-ban detektálható elváltozás kicsi, petechiális vérzések és/vagy hypodenz gócok formájában, elsősorban a szürke- és a fehérállomány határán, illetve a corpus callosumban és a hosszú pályák agytörzsi szakaszán⁴⁴(*1.A.ábra*).

A korai stádiumban végzett MRI a CT-nél hatékonyabb az elváltozások kimutatására. A nemhaemorrhagiás laesiok a T2-súlyozott és a protondenzitású képeken kis, ovális vagy kerek hiperintenzív jelek formájában láthatók (*1.D.ábra*), míg a vérzéses laesiok centrális területén hipodenzitás figyelhető meg.



1. ábra. Képalkotó vizsgálatokkal igazolt DAI (*sárga nyilak*) az agytörzsben a pons és a mesencephalon határán, dorsálisan. A CT felvételen minimális hypodenzitás látható baloldalon az agytörzsben (*A*), az SWI-vizsgálat jól mutatja a kiterjedt laesiót, illetve a subcorticalisan a fehérállományban jobboldalon temporálisan megfigyelhető hasonló elváltozást (*B*). A T1 (*C*) és FLAIR (*D*) súlyozott képek is jóval érzékenyebbek,mint a hagyományos CT vizsgálat.

Ezek az elváltozások a krónikus fázisban nagyon alacsony intenzitású laesiokként jelennek meg, mert haemosziderint tartalmaznak^{46,100}. Annak ellenére, hogy a fejlettebb MRI eljárások (diffúzió-súlyozott képalkotás, diffúziós tensor képalkotás 3 dimenziós tractográfiával, haemogradiens, susceptibility weighted imaging (SWI) *(1.B.ábra)*) megkönnyítik a kimutatását^{15,130,237}, a DAI teljes bizonyossággal még ma is elsősorban szövettani vizsgálattal (általában *post mortem*) diagnosztizálható^{78,79}.

A nyolcvanas években Gennarelli munkájának köszönhetően epidemiológiai módszerekkel sikerült igazolni, hogy a DAI 50%-ban felelős a tartós tudatzavarért illetve 35%-ban a mortalitásért a nem térfoglaló jellegű agysérülésekben⁷⁹.

1.3.1. Az axonduzzadás/axonballon-képződés jelensége

A diffúz axonkárosodás jelenségét Strich és munkatársai fedezték fel és írták le, mint a súlyos traumás agysérülések gyakori velejáróját. Olyan súlyos koponya-agysérültek poszt-mortem vizsgálata során, ahol érdemi fokális sérülést nem találtak, Strich ballonszerű axontágulatokat figyelt meg a fehérállományban "normális" axonok között elszórtan, amely tágulatoktól disztális axonszakaszon Waller-féle degeneráció és myelin-degradáció volt látható^{261,262}. Ezt az axonballon-képződést és az azt követő fehérállományi degenerációt Strich a trauma pillanatában kialakult azonnali axonszakadás következményének tartotta.

Hipotézise szerint a baleset során ébredő erők az axon szakadásához, az érintett proximális axonvég következményes visszahúzódásához és az axoplazma kiboltosulásához vezetnek, létrehozva ezzel a "retrakciós axonballont" a kórkép korai szakaszában (*2. ábra*); ehhez társul a későbbiekben a disztális axon szakasz Waller-féle degenerációja²⁶¹.



2. ábra. Tormagyökérperoxidáz jelölt károsodott axonok patkányban, két órával diffúz agysérülés után. A nyíl axonballont, a nyílhegyek duzzadtabb, de lefűződést nem mutató axonszakaszt jelölnek.

Míg Strich a megfigyelt elváltozásokat mint a "fehérállomány diffúz degenerációját" vagy "traumás idegrost szakadást" definiálta, a kórkép ma is használatos elnevezését, a "diffúz axonális károsodást", Adams adta², arra utalva, hogy a károsodott axonok elszórtan, ép

axonok között az agy egész állományára kiterjedve fordulnak elő. Adams és kollégái hangsúlyozták Strich óta először, hogy az axonkárosodás a koponyasérülés elsődleges következménye, szemben azon nézetekkel, amelyek az axonális károsodást másodlagos – oedéma, hypotensio és/vagy hypoxia következtében kialakult – elváltozásnak tartották⁸⁸. Adams és munkatársai ugyancsak úttörő munkát végeztek a humán diffúz axonkárosodás anatómiai lokalizálásában, illetve a klinikai gyakorlatban máig használt súlyosságmeghatározásban^{2,3}. E szerint a DAI típusosan a féltekei fehérállományban, a corpus callosumban, az agytörzsi hosszúpályákban, illetve kisebb gyakorisággal a kisagyban fordul elő fokális károsodás nélkül (1-es fokozat) vagy fokális laesiokkal a corpus callosumban (2-es fokozat) és a rostralis agytörzsben (3-as fokozat).

A kórkép Strich és Adams szerinti patomechanizmusa – azaz, hogy az axonszakadás a trauma pillanatában *azonnal* bekövetkezik és emiatt terápiásan nem befolyásolható – évtizedekig elfogadott volt; mindez a kórkép kutatását és kezelését hosszú ideig hátráltatta²³. A diffúz axonális károsodásnak ugyanakkor mai tudásunk szerint legalább két, morfológiailag jól elkülöníthető megjelenési formája ismert: az axonduzzadás/axonballon-képződés és az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció. A DAI-kutatások kezdetben az axonduzzadás vizsgálatára irányultak; az ultrastrukturális kompakció jelensége később került csak leírásra¹⁹⁴. A klasszikus elképzelés szerint e két morfológiai jelenség kiváltásában ugyanazok a tényezők játszanak szerepet, ezáltal ugyanazokat az axonokat érintik; a legújabb nézetek szerint azonban – a legtöbb esetben – a kétféle elváltozás két jól-elkülöníthető axonpopulációban figyelhető meg (*ld. lent*)^{149,259}.

A traumás axonkárosodási vizsgálatok túlnyomó többsége különböző állatkísérletes modelleket alkalmaz a kórkép feltérképezésére és befolyásolásának vizsgálatára. Ezek a modellek – természetesen – nem képesek a humán viszonyokat és így a humán DAI teljes spektrumát, kiterjedését és időbeni lefolyását maradéktalanul reprodukálni, ezért helyesebb az állatkísérletekben modellezett axonkárosodást traumás axonkárosodásként (traumatic axonal injury, TAI) említeni, a DAI kifejezést pedig a humán esetekre fenntartani¹⁵⁶. Korlátaik ellenére azonban az állatkísérletes modellek egyedülálló mértékben járultak hozzá a humán DAI kialakulása alapvető elemeinek feltérképezéséhez, segítségükkel ugyanis a humán DAI számos aspektusa – fokális elváltozásokkal kísérve vagy önmagában – megbízhatóan vizsgálható.

Bár Maxwell és munkatársai fenti, a nevezéktanra vonatkozó érvelésével¹⁵⁶ maradéktalanul egyet értünk, a disszertációban több alkalommal keverednének a TAI-ra illetve DAI-ra vonatkozó, gyakran átfedést mutató megjegyzések, ezért az egyszerűség

kedvéért e munkában a továbbiakban kizárólag az utóbbi elnevezést/rövidítést kívánjuk alkalmazni.)

Az axonduzzadás/axonballon-képződés 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 és véglegesen kialakuló axonszakadást jelent, hanem a károsodott axonok döntő többségében egy időben fokozatosan progrediáló folyamatról van szó²¹⁴ (2. *ábra*). Azóta ez az elmélet számos állatfajban és traumamodellben, valamint humán szövetmintákon is igazolást nyert^{24,26,38,44,57,64,79,81,86,164,194,209-211,213,217,240,242}.

A DAI kialakulásának Povlishock-jegyezte elmélete szerint ezen axonális károsodásért elsődlegesen a középsúlyos illetve a súlyos koponyatrauma által kiváltott nyíróerők felelősek, amelyek az axonokban ébredő több, fény- és elektronmikroszkóp segítségével vizsgálható kórfolyamatot is elindítanak. Eszerint a károsodott axonszakaszok a sérülést követően azonnal (<5 perc) fokális *axolemmális permeabilitási zavar*t mutatnak ("mechanoporáció"), amely folyamatot az szemlélteti és igazolja, hogy a károsodott axonok nagy molekulasúlyú anyagokat (pl. tormagyökér-peroxidázt, vagy dextránokat) vesznek fel, amelyek az ép axolemmán keresztül az egszséges axonokba illetve neuronokba nem tudnak bejutni^{194,195,215,218,219,259} (2. *ábra*). Az axolemma fokális sérülését egyéb morfológiai jellemzők kísérik: *mitochondrium duzzadás*^{155,194,195}, *neurotubulus eltűnés*^{151,153,195}, *neurofilament-módosulás*^{111,112,186,195,218,219,255}, *axonális transzportzavar*^{218,219,258} mely utóbbi az előre irányuló intraaxonális transzport – egy ponton való – fokális leállásában nyilvánul meg, és az ilyen módon szállítódó sejtalkotók illetve egyéb anyagok felhalmozódásához (*organellum-akkumuláció*) és következményes *axonduzzadás*hoz vezet^{154,156,213,214}.

A traumától eltelt idő előrehaladtával az axonduzzadás egyre nagyobb mértékű lesz, és végül az érintett axonszakasz ballon formájában lefűződik, létrehozva ezzel a kórkép korai leírásaiból ismert proximális *axonballon*okat, míg a disztális axonszakasz Waller-féle degenerációt szenved^{32,156,210,214,217}.

A DAI-ra jellemző fenti morfológiai elváltozásokat a humán DAI későbbi tanulmányozása során szintén egytől egyig leírták^{22-24,44,81,86,183,240,242}. Figyelemre méltó, hogy az axonális elváltozások kezdetétől az axonballon kialakulásáig illetve az axonszakadásig eltelt idő a trauma súlyossága- és a vizsgált species függvényében változik; emberben tipikusan órákban, napokban mérhető^{240,242,292}, azaz emberben a kezelésre rendelkezésre álló ún. terápiás ablak jóval hosszabb, mint kísérleti állatokban.

Az axoplazmatikus transzport folyamatának zavarán alapul az axonduzzadás-

ballonképződés kimutatásának módszertana is: a gyors axoplazmatikus transzporttal előre szállított és annak károsodásakor a sérülés helyén felhalmozódó anyagok elleni antitestek alkalmazásával végzett immunhisztokémiai módszer. A legelterjedtebb ilyen technika a béta amyloid precursor protein (APP) nevű transzport-fehérje felhalmozódásának kimutatása, amely viszonylag egyszerű, ezért a DAI diagnózisának legszélesebb körben alkalmazott módjává vált^{81,136,240,242}, annak ellenére, hogy a legújabb vizsgálatok szerint valószínűleg alulbecsüli a DAI mértékét^{32,148,259}.

1.3.2. Az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (UC, NFC)

Az axonkárosodás ezen morfológiai változatát két évtizede írták le, összefoglalva az intraaxonális citoszkeleton kompakcióját (a neurofilamentumok közötti távolságok lényeges csökkenése, neurofilament kompakció, NFC), a mikrotubulusok számának csökkenését és a neurofilament-oldalkarok módosulását^{44,86,111,112,194,218,219,293}.

Kezdetben úgy gondolták, hogy a citoszkeletális elváltozások ugyanazokat az axonokat érintik, mint az axonduzzadás/ballonképződés. A hipotézis szerint az NFC következményeként áll le az axonduzzadáshoz vezető előreirányuló intraaxonális transzport^{153,156,194,195,219}. Ezt támasztották alá azok a kísérletek is, melyek szerint az intraaxonális transzportzavart mutató APP-pozitív axonok és az NFC-t mutató RMO-14pozitív axonok ugyanazon anatómiai régiókban fordulnak elő és befolyásolásuk ugyanazon kezelési eljárásokkal volt lehetséges^{31,184,187}.

Mára azonban bebizonyosodott, hogy a DAI két, jól elkülöníthető morfológiai jellemzője, tehát az axonduzzadás/ballonképződés, illetve az NFC két különböző axonpopulációt érint az esetek túlnyomó többségében, és csak kis részben figyelhető meg egyazon károsodott axonon belül, leginkább a lemniscus mediális nagy kaliberű axonjaiban^{149,259}. Az NFC kimutatására a közepes méretű NF alegység (NF-M) elleni RMO-14 antitestet alkalmazzák *(3.ábra)*, amely az axonális citoszkeleton strukturális átrendeződése folyamán (a calpain által mediált strukturális fehérjebontás következményeként, részletesen lásd később) szabaddá vált NF-M "rúd alegység -rod domain"-hez képes kötődni^{131,218}.



3. ábra. Neurofilamentum ellenes antitestek cél-epitópjai. A sematikus ábrán jól látható, hogy az RMO-14 antitest csak az M-alegység oldalkarjának eltűnése (proteolytikus hasítás, dekarboxilálódás) esetén képes kapcsolódni (*Trojanowsky nyomán*).

Az immunhisztokémiai technikát alkalmazó vizsgálatok legkorábban 15 perccel a koponyatrauma kiváltása után tudtak axon-kompakciót kimutatni. Ugyanakkor egy speciális ezüstözési eljárással a trauma után azonnal leölt, illetve *post mortem* koponyatraumát szenvedett állatokban is kimutatható egy – hosszú axonszakaszok megvékonyodásával járó – argyrophil károsodás, amely fénymikroszkópos megjelenése lehet az NFC-nek^{74,75}. E jelenség más megvilágításba helyezi az NFC kialakulásának mechanizmusában feltételezett enzimatikus reakciók kizárólagos szerepét, felvetve, hogy a citoszkeletonban tárolt szerkezeti energia is képes lehet bizonyos kórfolyamatok elindítására.

1.4. Kalcium indukálta fehérjebontó folyamatok szerepe az axonkárosodásban

A Ca²⁺-dependens folyamatok közül az egyik legfontosabb a calpain aktiválódása, amelynek számos idegrendszeri kórkép kialakulásában – köztük az utóbbi évek kutatásai alapján a traumás agysérülések fokális^{97,175-177,199-201,208,225} illetve diffúz^{123,124,224} típusában is – fontos szerepe van. A calpain a cisztein proteázok családjába tartozó enzim. Több fajtája ismert, ezek közül a calpain-1 vagy μ -calpain és a calpain-2 vagy m-calpain a központi idegrendszerben mindenhol előfordul²⁸⁷. Számos szubsztrátját azonosították (pl. citoszkeletális fehérjék)^{35,42,287}, és élettani szerepe van az idegsejt fejlődés és a szinaptikus struktúra kialakításában⁴², túlműködése azonban a sejt számára végzetes lehet^{42,287}. Szerepe elsősorban a nekrotikus sejthalál kialakulásában nagy jelentőségű, de a legújabb kutatások szerint egyes apoptotikus folyamatok során is aktiválódik¹⁷⁴.

Míg a perikaryonokat érintő kórfolyamatok esetében a Ca^{2+} beáramlás, intraneurális Ca^{2+} akkumuláció káros hatása széles körben vizsgált s elfogadott jelenség^{244,246}, addig a Ca^{2+} indukálta proteolytikus folyamatok szerepe az axonok károsodásában korántsem ennyire nyilvánvaló. Az axonokon egyrészt nincsenek excitatorikus aminosavak által szabályozott Ca^{2+} csatornák, másrészt a

feszültség szabályozott csatornák denzitása a myelin hüvellyel borított axonszakaszon rendkívül alacsony^{263,291}.

A klasszikus elméletek szerint az axon károsodásakor a tengelyfonatokra ható nyíróerők következtében létrejövő axolemmális permeabilitás változás (ún. mechanoporáció) hatására beáramló Ca²⁺ proteolytikus enzimeket aktiválna, melyek azonnal megtámadják és az axon egészében igen rövid idő alatt "megemésztik" a struktúrális fehérjéket^{10,154,158}. Az intraaxonális Ca²⁺ beáramlás *in vivo* igen nehezen megfogható, ugyanígy a Ca^{2+} -indukálta proteolytikus folyamatok követése is hosszú időn át nehézségekbe ütközött. A Ca²⁺ aktiválta proteolízis vizsgálatát ugyanakkor forradalmasította, hogy Siman és munkatársai olyan immunsavót állítottak elő, mely a mikromoláris calpain által hasított alfa-spectrin alegység 150kD molekulasúlyú fragmentumát, egy rendkívül stabil, más proteázok által nem képzett fehérjét ismeri fel^{223,248-250}. Immunelektronmikroszkópos vizsgálatok a spectrin molekula számos változata közül a neurális formát, a két alfa és két béta alegység alkotta "agyi/brain spectrint" vagy fodrint az axoplazmában, a citoszkeleton elemeihez kapcsoltan találták meg^{84,297}. A citoszkeletont a spectrin az axoplazmában található további elemekhez, főként mitochondriumokhoz rögzíti, ugyanakkor a mitochondriumok felszínén is spectrin "háló" alakul ki. Emellett, mint az axolemma alatt található subaxolemmális hálózat vagy más néven kortikális citoszkeleton, (membrán-szkeleton) alkotóeleme, a spectrin ankyrinen keresztül illetve közvetlenül, ún. "non-ankyrin-binding domain"-eken keresztül is kapcsolódik integráns membránfehérjékhez^{54,84}. A spectrin részt vesz a szinaptikus vezikulák kiürítésében, továbbá a fentiekben ismertetett anatomiai lokalizációjának megfelelően a membrán szerkezeti integritásának elengedhetetlen eleme. Utóbbi szerepére példa a spherocytosis nevű kórkép létrejötte, melynek hátterében az erythroid spectrin szerkezeti hibája áll^{101,84}. A calpain - fiziológiás folyamatokban igazoltan - képes a spectrin hasításával a membrán szerkezetének átalakítására, mint például a myoblast fúzió során¹²⁶.

Miközben a spectrint a calpain *fiziológiás* aktivitásának, *a limitált strukturális proteolízis*nek egyik feltételezett szubsztrátjaként azonosították, egyre nagyobb érdeklődés övezte a calpain *"túlindukciója"*, azaz a *patológiás* szintű Ca²⁺-koncentráció okozta enzimaktiválódás következtében létrejövő spectrin-lebomlás patofiziologiai szerepét különböző kórképekben^{12,13,18,40,41,68,84,137,223,248-250,297}.

A fent említett immunsavót felhasználva- calpain-specifikus spectrin fragmentumot (SBDP) találtak károsodott perikaryonokban és nekrotikus környezetben elhelyezkedő axonokban^{16,17,115,175,225}, calpain antagonisták adásával pedig az állatok funkcionális felépülése javíthatónak tűnt^{207,228}.

Ezek a modellek kivétel nélkül súlyos agy/gerincvelő sérüléssel, kitejedt nekrotikus üreg képződésével jártak, tehát olyan folyamatokat vizsgáltak, amelyekben a Ca²⁺ jelentős mennyiségben válik szabaddá és kiterjedt membránkárosodás alakul ki.

Arról, hogy a diffúz agysérülés során/diffúz agykárosodás kísérletes modelljeiben milyen szerepet játszik a a Ca²⁺-beáramlás indukálta szerkezeti fehérjebontás, a disszertáció alapjául szolgáló kísérletektől vártunk részletes információt.

A vizsgálatok megkezdése előtt két feltételezés volt, az egyik szerint "minden vagy semmi" -alapon aktiválódva excessive fehérjebontást indukál a Ca²⁺ -beáramlás^{153,156}, míg más elképezelések szerint a DAI-t a permeabilitás-változás alapján elemző vizsgálatokban a tormagyökér peroxid jelölt, tehát permeabilitási zavart szenvedett axonok finomszerkezete túlságosan intakt volt ahhoz, hogy a fenti elképzeléseknek megfelelő proteolytikus "ámokfutás" bekövetkezését alátámaszthassa^{186,194,195}.

1.5. Periszomatikus axonkárosodás és diffúz neuronális károsodás

Míg szerző és munkacsoportja kutatásai elsősorban az agytörzsi, kisebb részben a gerincvelői hosszúpályákban kialakuló DAI vizsgálatára irányultak, más kutatók a periszomatikus régióban létrejövő axonkárosodás és a kapcsolódó neuron vizsgálatára irányították figyelmüket, illetve arra fókuszáltak, hogy ugyanazok az erők, melyek diffúz axonkárosodást váltanak ki, okoznak-e diffúz eloszlásban, egyébként ép szöveti környezetben neuronális sérüléseket. E vizsgálatok megállapították, hogy a – várttal ellentétben – a sejttest közelében kialakuló axonszakadás nem feltétlenül vezet a neuron gyors halálához, hanem az érintett neuronokban a sérülés kiváltása után a mitochondriumok és a citoszkeleton épsége mellett a durva endoplazmatikus retikulum /ER/ és a poliriboszómák degranulációja illetve a Golgi ciszternák diszperziója megy végbe.

Immunhisztokémiai (IHC) módszerekkel ezen idegsejtekben a fehérjeszintézis átmeneti zavarát igazolták, ami azonban hosszabb idő elteltével sem feltétlenül progrediált, számos esetben ugyanis reorganizáció és az ultrastruktúra helyreállítódása volt megfigyelhető, azaz az axonszakadás nem feltétlenül eredményezi a kapcsolódó neuron gyors pusztulását²⁵³. Ugyanakkor az agytörzsi hosszúpályákban általunk is megfigyelt, időben elhúzódó axonszakadással ellentétben, a periszomatikus régióban (neocortex, thalamus) gyors, (15 percen belüli) axonszakadás, majd kísérő Waller-féle degeneráció volt megfigyelhető¹¹⁷. Ugyancsak ellentmondó megfigyelés, hogy a hosszúpályákban általunk is igazolt axolemma permeabilitási zavar a periszomatikus régióban nem volt igazolható sem axontranszportzavart mutató-, sem azt nem mutató axonok körében¹¹⁷.

A diffúz koponyatrauma közvetlen neuronális hatásának vizsgálata során Singleton és munkatársai számos elváltozást írtak le. Nagy molekulasúlyú anyagokat használva jelölő anyagként megállapították, hogy a traumát szenvedett neuronok egy részében az axonokhoz hasonlóan sejtmembrán permeabilitási zavar jön létre (azaz az érintett neuronok felveszik az ép sejtekből a sejthártya által kiszorított tracer-t) a trauma után közvetlenül (mechanoporáció). Ez az esetek egy részében gyors – nekrotikus – sejthalálhoz vezet, a permeabilitási zavart mutató neuronok egy csoportjában azonban a súlyos sejtkárosodás jelei nem voltak egyértelműen megfigyelhetőek. Ugyanezekben az agyi régiókban ugyanakkor sejtmembrán permeabilitási zavart nem mutató neuronok is károsodást szenvedtek, ezekben periszomatikus axonlaesio vagy axonlaesiotól független stresszreakció volt igazolható szintén súlyos ultrastrukturális károsodás nélkül²⁵¹.

A trauma pillanatában permeabilitási zavart szenvedett neuronok további vizsgálatával az is kiderült, hogy az érintett neuronok egy részében a sejtmembrán helyreállítódik, e neuronok ultrastrukturálisan épek maradnak. A neuronok egy másik csoportja csak órákkal a trauma után szenved permeabilitás-változást. Meglepő megfigyelés volt, hogy míg axonok esetében általunk bizonyítottan a permeabilitás változás együtt jár a calpain aktiválódásával és spectrin bontással (calpain-mediált spectrin proteolysis, CMSP), addig a permeabilitási zavart szenvedett neuronok csak kis részében figyelhető meg CMSP, illetve a CMSP-t mutató neuronok csak egy részében igazolható membrán károsodás⁵⁸.

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

A diffúz axonkárosodásra vonatkozó finomszerkezeti vizsgálatok egybehangzó megállapítása volt, hogy az axon-sérülés helyén károsodott mitochondriumok szaporodnak fel. Az érintett axonszakaszokon már 5 perccel a trauma után ballonszerűen duzzadt mitochondriumok jelennek meg, melyeknek általában már krisztái sem láthatók. David Okonkwo felismerése volt, hogy e jelenség morfológiailag teljesen megfelel a mitochondriális permeabilitási tranziciós pórus kinyílását követő végzetes mitochondriális duzzadás képének, azaz valószínűleg az axolemma károsodásának hatására kialakuló intraaxonális Ca²⁺ - akkumuláció további következményének tekinthető^{44,194,195,216,218,219}.

Maga a permeabilitási tranzíció ("mitochondrial permeability transition", MPT) jelensége fiziológiás, a mitochondriálisan tárolt Ca²⁺ kiáramlásáért, s így a "Ca²⁺ indukálta Ca²⁺ felszabadulás" kialakulásáért felelős^{244,246,276}. Ugyanakkor a pórus "túlaktiválódása" az 1.5 kD molekulasúly alatti

anyagok beáramlásához, következményes folyadék-akkumulálódáshoz, a mitochondrium duzzadásához, a külső, kisebb felületű membrán következményes szakadásához s az organellum pusztulásához vezet^{168,246,300}. Ez a fajta túlaktiválódás akkor jön létre, amikor a citoplazmatikus/axoplazmatikus Ca²⁺-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 proteolytikus emésztése^{6,85}.

A MPT jelenségének kialakulását hatékonyan gátolja a transzplantációs gyakorlatban szervkilökődés gátlására –tartós adagolásban- használt immunofillin, a cyclosporin A $(CsA)^{21,49,70,91,96,125,134,178,235,275,296}$. Habár a CsA-t korábban trauma modelleken nem alkalmazták, több munkacsoport igazolta, hogy a szer alkalmas lehet az ischaemiás eredetű neuron-károsodás kivédésére a mitochondriumok működőképességének fenntartása, s az ionhomeostasis helyreállítása révén^{49,65,70,91,96,134,247,275,277}.

Az MPT jelenségének a DAI kialakulásában játszott szerepe tisztázásához döntően hozzájárult Okonkwo és Povlishock úttörő jelentőségű kísérlete¹⁸⁷, mely igazolta, hogy a CsA harminc perccel a trauma előtt adva képes kivédeni a sérült, tormagyökér peroxidázt akkumuláló axonokban a mitochondriális károsodás kialakulását. Túl ezen, huszonnégy órával a trauma után a CsA-előkezelt állatokban a béta-amyloid precurzor proteint halmozó, azaz megszakadt axoplazmatikus transzportot mutató, duzzadt axonok denzitása a DAI-nak kitett idegpályákban szignifikánsan lecsökkent¹⁸⁷. További kísérletek azt is igazolták, hogy a trauma előtt, illetve után intraciszternálisan adott CsA a mitochondrium szerkezeti egységének és funkcionális állapotának megőrzésén keresztül képes a proteolytikus folyamatoknak az energiaháztartás zavara által előidézett tovaterjedését és felgyorsulását megakadályozni^{31,184,215}. Megfordítva: a mitochondriális károsodás befolyásolása kedvező (gátló) hatással bírt az intraaxonális proteolízisre, valamint a citoszkeletális átrendeződésre.

A michondriumok integritásának és a lokális energia-homeosztázis fenntartásának a károsodott axonok szerkezeti integritásának megőrzésében játszott szerepét támasztják alá azok a megfigyelések is, melyek a hypothermia-kezelés jótékony (axonoprotektív) hatására vonatkoznak (*ld. lent*).

A CsA alkalmazásával nyert megfigyelések tették lehetővé a DAI patogenesisének teljesebb feltárását, tisztázva a mitochondrium direkt károsodása, a mitochondriális permeabilitási tranziciós pórus kinyílása és a proteolyticus folyamat kibontakozása közötti kapcsolatot. A mitochondriális permeabilitási pórus kinyílása, melyet DAI-ban a CsA-kezelés hatékonysága indirekt módon igazolt, továbbá a mitochodriumok elektronmikroszkóposan megfigyelt morfologiai változásai arra utaltak, hogy olyan proapoptoticus mediátorok

szabadulhatnak fel a károsodott axonokban (cytochrome c, apoptosis aktiváló faktor /APAF/, apoptosis indukáló faktor /AIF/), melyek további fehérjebontó enzimek aktiválódását is maguk után vonhatják, így a caspase enzimcsalád 3-mas számmal jelölt, az apoptózis folyamatában kulcsszerepet betöltő tagja is aktiválódhat ^{93,182,245,266,267,278}. Ez az enzim a béta alegységnél támadva - szemben a calpainnal – irreverzibilisen hasítja a spectrin molekulát, ami ekkor teljes mértékben elveszíti a membránhoz való kötődés képességét^{287,289}. Továbbá, előzetes vizsgálatok eredményei szerint, a caspase-3 esetleges aktiválódása a calpain fiziológiás gátló enzimjét, a calpastatint is hasítja, tovább gerjesztve ezzel a calpain aktivitását^{176,206,257,288}. Ezen folyamatoknak az axonban történő esetleges aktiválódásának egyenes következménye csak az irreverzibilis axonkárosodás lehet.

Elvi kérdés természetesen, hogy az apoptotikus enzimek a neuron/axon-károsodás klasszikusan nekrotikus eredetűnek tartott modelljében, a DAI-ban szerepet játszhatnak-e? Koponyasérülés során a mechanikai energia okozta elsődleges károsodás mellett másodlagos autodestruktív folyamatok is elindulnak. Állatkísérletekben az alkalmazott modell típusától, az erőbehatás nagyságától, nemtől és életkortól, sejttípustól és agyi régiótól függően különböző sejthalál-mechanizmusok aktiválódnak. Az elmúlt évtized kutatásai során egyre több bizonyíték gyűlt össze a stroke, a neurodegeneratív betegségek, valamint a neurotrauma területén, amelyek megkérdőjelezik a jelenleg is érvényben lévő "nekrózis- apoptózis" paradigma helyességét⁸⁷.

Jelenlegi ismereteink szerint a sejthalál-mechanizmusok jellemezhetők egyrészt a mikroszkópos, illetve ultrastrukturális morfológiai képpel (fenotípus), valamint a genetikai program megvalósulása során zajló génexpressziós változásokkal (genotípus). A klasszikus nekrózis a membránintegritás megszűnésével, duzzadással, a sejtorganellumok szétesésével, valamint gyakran gyulladásos infiltrációval járó folyamat. A korábbi elképzelésekkel ellentétben, amelyek a nekrózist kaotikus, mindenféle vezérlést nélkülöző folyamatnak tartották, újabban génexpressziós változásokat, és Ca^{2+} -függő, aktív proteolízist is sikerült igazolni, például Nematodákban. A mechanizmus kulcsenzimének a Ca^{2+} - aktivált cisztein proteázt, a calpaint, valamint az elsősorban a lizoszómákban megtalálható katepszint tartják^{60,132,268,295}.

Az apoptózis a klasszikus definíció szerint a filogenezis során meglehetősen konzervált, fiziológiás folyamatot jelez, amelynek szerepe a szöveti homeosztázis fenntartása. Jellegzetessége a kromatinkondenzáció, a magfragmentáció, a sejtzsugorodás, valamint az apoptotikus testek képződése, amelyeket makrofágok takarítanak el. Mivel az apoptózis szemben a nekrózissal bizonyos fokig energia igényes folyamat, ezért elsősorban az

ischaemiás vagy traumás sérülés nekrotikus fókusza körül elhelyezkedő "penumbra" területen fordul elő. Kulcsenzime a caspase, az aszparaginsav mellett hasító ("cisztein-") proteáz, amely intrinsic (mitochondrium károsodás) és extrinsic ("halálreceptorok") módon aktiválódhat.

Az apoptózisnak ugyancsak ismert caspase-tól független formája is, amelyben különböző faktorok – mint az AIF vagy endonukleáz G (mitochondrialis nukleáz) – mediálják a programozott sejthalálra jellemző fenotípus megjelenését^{294,281}.

Egyes vizsgálati eredmények szerint a sejtet ért inzultus (jelen esetben a mechanikai energia) erősségétől, a Ca2+-felszabadulás mértékétől, illetve az intracelluláris ATP-szinttől függ, hogy a sejt a nekrotikus vagy az apoptotikus utat választja⁵⁶. Feltételezik azt is, hogy az egyik út gátlása a másik irányába terelné a sejtpusztulás kivitelezését^{25,63,205}. Természetesen mind a nekrózis, mind az apoptózis csak abból a genetikailag előre meghatározott eszközkészletből (jelátviteli utak, effektor proteázok stb.) válogathat, amelyből a fiziológiás működések is¹⁴¹. Ezért az élettani illetve a különböző noxák által elindított patológiás folyamatok a genotípusukban és ez által a fenotípusukban is hasonlíthatnak egymáshoz. Egyes szerzők a nekrózist és az apoptózis egy képzeletbeli spektrum két szélén helyezik el, amely között bármilyen "hibrid" előfordulhat²⁹⁴. Mások nekrózis, "nekrózis-szerű", "apoptózis-szerű", és apoptózis kategóriákat használnak^{132,140,141}. Az eddigiekből jól kitűnik, hogy – habár különböző sejthalál-típusokról beszélünk, és azok igen komplexek – ezek gyakran ugyanazokat a szignáltranszdukciós utakat használják⁶⁶. A kaszkádok effektorai az említett proteázok, amelyek egymás regulációjában is részt vesznek, jó példa erre a calpain és a caspase között feltételezett párbeszéd^{172,287}.

1.7. Diffúz agysérüléshez társuló gerincvelő károsodás

A DAI kialakulására vonatkozó ma elfogadott, fent részletezett elgondolások alapvető szerepet tulajdonítanak a sérülést kiváltó mechanikai erők (gyorsulás-lassulás, centrifugális erő) hatására létrejövő axonköteg-vongálódásnak, melyek az ismert "predilekciós helyeken" (subcorticális fehérállomány, corpus callosum, agytörzs) hoznak létre diffúz axonális károsodást^{4,22,79}.

Rágcsálókban a fenti elváltozásokat legmegbízhatóbban az ún. impakt akcelerációs vagy súly-ejtési modellekben tudjuk előidézni, melyek lényege, hogy az agytörzsben az axonkárosodást az alátámasztott fej tetejére ejtett súly hatására a craniocervicális átmenetben létrejövő hirtelen flexio (a fehérállományi pályák megnyúlása) hozza létre^{146,218}. Annak

ellenére, hogy a sérülés mechanizmusa alapján logikus volna, hogy a gerincvelőben is létrejöjjenek károsodott axonok, ilyen jellegű vizsgálatok alig történtek. Lighthall¹³⁹ közvetlen agykérgi sértést kiváltó (controlled cortical impact, CCI) modellben, Hamberger⁹⁸ pedig rotációs gyorsulási modellben írt le elszórtan károsodott axonokat az agytörzs és a gerincvelő átmeneti szakaszán (cranio-cervicális átmenet, CCJ). Emberben csak anekdotikus közlésként említi Shannon, hogy "megrázott gyermek szindrómában", azaz "shaken baby syndrome"-(SBS)- esetén a nyaki gerincvelőben károsodott axonokat látott²³⁹.

A jelenség szisztematikus vizsgálatára mindeddig annak ellenére nem került sor, hogy az axonkárosodás esetleges kimutatása támpontot adhatna a humán esetek igazságügyi orvos szakértői boncolásának kiterjesztéséhez (gerincvelői szegmentumok részletes elemzése) illetve az axonszakaszok vongálódását követő axonkárosodás vizsgálata a spondylotikus myelopathia illetve a centrális gerincvelő sérülés kóreredetére vonatkozóan is újabb adatokkal szolgálhatna.

1.8. Prognosztikai faktorok, biomarkerek szerepe a súlyos koponyasérültek ellátásában

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben több mint félszáz, neuroprotektivnek tartott szer illetve eljárás klinikai kipróbálása történt meg, még a legígéretesebbek (N-metil-D-aszparaginsav /NMDA/- és 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-il)- propionsav /AMPA/-receptor-antagonisták, szteroidok, lipidperoxidáz-gátlók, gyökfogók, Ca²⁺-csatorna-blokkolók, hypothermia) is kudarcot vallottak^{173,274}.

Ennek hátterében nemcsak a terápiás modalitások nem megfelelő megválasztása, hanem a terápia hatékonyságának megítélésére alkalmazott módszerek (Glasgow kimeneteli skála, koponyaűri nyomás/perfúzió) nem megfelelő érzékenysége is áll²²⁶. 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.

A GCS alkalmazhatóságát a vitathatatlanul csekély, de az eredményeket könnyen befolyásoló, az egyes értékelők közt fellelhető pontozási különbség illetve a korszerű ellátási protokollokban alkalmazott korai mély sedatio és izomlazítás korlátozza^{67,11,233}.

A koponya-CT-felvételeken számos, a sérülés kiterjedésére utaló és a kimenetellel is kapcsolatba hozható elem látható (fokális sérülés térfogata, kamra kompresszió, középvonaldiszlokáció, bazális ciszternák kompressziója), mindazonáltal, különösen diffúz elváltozások

esetén, a vizsgálat specifikussága, szenzitivitása és így prediktív értéke is kicsi, ráadásul a beteg szállítását feltételezi¹⁰⁸.

A koponya MR vizsgálata, különösen a T1-víztérképek, diffúzió súlyozott vizsgálatok, illetve a diffúziós tenzor képalkotás valamint legújabban a haemogradiens illetve "SWI"-vizsgálatok a diffúz károsodás mértékéről is adhatnak felvilágosítást, de sem a vizsgálat ára, sem időigényessége, sem pedig speciális technikai feltételei (MR-kompatibilis respirátor, monitor stb.) nem teszik lehetővé rutinszerű alkalmazását^{59,61,107,189,236,270}.

A korszerű neuromonitorozás során nyert adatok (koponyaűri nyomás, artériás középnyomás, agyi perfúziós nyomás, vérgázértékek, agyszöveti oxigénnyomás) elsősorban a primer károsodás súlyosságára és az esetleges súlyos másodlagos károsodás kialakulására figyelmeztetnek, ám ezek a paraméterek sem adnak információt az agyban zajló biokémiai folyamatokról^{82,95,232}.

Több évtized alapkutatási vizsgálatai ellenére sem rendelkezünk olyan specifikus laboratóriumi vizsgálóeljárással illetve ágy melletti, "on-line" agyvíz vagy szérum-analízist 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.

Az ideális biomarkerrel szemben támasztott alapvető elvárások az alábbiak: vérből és/vagy liquorból kimutatható legyen, megjelenése legyen arányos a mechanikai erőbehatással és a sérülés nagyságával. Fontos a specifikusság, és a nagy szenzitivitás. Lehetőleg a sérülést követően rövid látenciával jelenjen meg a testnedvekben, mutasson jól definiált időbeli eloszlást^{19,110,203}.

Sajnálatos módon azok a feltételezett biológiai markerek, melyekhez korábban nagy reményt fűztek, mint a gliális fibrilláris acidikus protein (GFAP) vagy a neuron specifikus enoláz (NSE) csupán az ún. "surrogate", "helyettesítő" marker szintjét érik el, azaz legfeljebb utalhatnak bizonyos jelenségekre, de specifikus biokémiai folyamatokról nem adnak információt²⁰³.

A fent felsorolt összes elvárásnak leginkább az egyes fehérjebontó folyamatok hatására keletkező, egy specifikus enzim-aktiválódását kézjegy-szerűen jelző fehérje-lebontási termékek ("signature protein") felelhetnének meg.

1.8.1. Spectrin és lebontási termékei

A spectrin nevű szerkezeti fehérje jelentőségére és lebontásának potenciális következményeire a korábbi szakaszokban részben már kitértünk, röviden összefoglalva: a

non-erythroid αII-spectrin (280 kDa) a corticális citoszkeleton egyik fő komponense. Elsősorban a preszinaptikus terminálokban, illetve a tengelyfonalak subaxolemmális kompartmenjében fordul elő^{53,84,297}. Az utóbbi két évtized vizsgálati eredményei bizonyították, hogy a spectrin mind a calpain-, mind a caspase-3-mediált hasítás szubsztrátja. Amíg a 150 kDa nagyságú lebontási termék nem specifikus (mindkét enzim képez ilyet), addig a 145 kDa molekulatömegű a calpain, azaz a nekrotikus folyamatok, míg a 120 kDa nagyságú degradátum a caspase-3, apoptoticus proteáz működésére jellemző^{104,248,290}. A spectrin agyi ubikviter jellege alapján alkalmasnak tűnt a sejtpusztulás és az axonkárosodás kimutatására, amelyet számos állatkísérletes modellben és humán vizsgálatban bizonyítottak^{115,197,198,225}.

Habár a koponyatrauma által kiváltott fokális illetve diffúz agysérülések eltérő módon jönnek létre és klinikai manifesztációjuk is különböző, hasonló biokémiai folyamatok mindkét forma progressziójában szerepet játszanak. Ilyen folyamat a calpain és a caspase aktiválódása is^{114,115,175,200,225}. Ezek következtében specifikus spectrin-degradációs termékek (SBDP) felszaporodása figyelhető meg az agyszövetben mind állatkísérletekben^{122,123,224}, mind humán koponyatraumát követően¹⁶⁰, illetve kísérleti állatokban az agyvízben¹⁹⁸. Állatkísérletben az SBDP-liquorszint szignifikáns emelkedését észlelték 24–72 óra között, valamint korrelációt igazoltak az erőbehatás erősségével, illetve a laesio nagyságával¹⁹⁸. Az SBDP klinikai alkalmazásában rejlő lehetőségeket a disszertáció alapjául szolgáló vizsgálatokig csupán kis betegszámú, csekély statisztikai erejű, "peer reviewed" publikációban nem közölt előzetes humán vizsgálatok során elemezték⁴⁸, ezek során néhány súlyos koponyasérültben a spectrin- és SBDP-szintek szignifikáns emelkedését észlelték a nem-sérült kontrollokhoz képest.

1.8.2. Prognosztikai modellek

Miközben a biomarkerek kutatását az agysérülés kimenetelét illetve súlyosságát jelző egyik legígéretesebb lehetséges iránynak tartjuk, érdemes áttekinteni, hogy a rendelkezésre álló klinikai adatok elemzésével milyen (prognosztikai-) következtetéseket vonhatunk le.

Több korábbi vizsgálat elemezte a pupilla átmérőjének, az areactiv tág pupillának, a sérülés után eltelt időnek, a beteg életkorának valamint a CT vizsgálat eredményének viszonyát a várható kimenetellel. Miközben e faktorokat, mint a kimenetel független prediktorait azonosították, kevés rendszerezett vizsgálat nyújtott a sérülés várható kimenetelére vonatkozó -a klinikai gyakorlatban valóban használható- információt.

Mivel a korai szedáció a GCS prognosztikai értékét erősen csökkentette, a vizsgálatok egyik fő célpontja az első CT felvételeken látható elváltozások klasszifikációja lett. Ettől a felismeréstől vezérelve Marshall és mtsai. 1991-ben létrehoztak egy a beteg felvétele után rutinszerűen készített első koponya CT vizsgálat elemzésén alapuló rendszert, mely a súlyos koponyasérülteket hat kategóriára osztja. Ez a beosztás a diffúz sérülések négy csoportját különbözteti meg, elsősorban a középvonal eltolódása illetve a bazális ciszternák állapota alapján, valamint a 25cm³-nél nagyobb - vérzésre utaló – magas vagy kevert denzitású laesio sebészi eltávolítása/eltávolíthatósága alapján további két kategóriát ír le. Ez az alapvetően diagnosztikus célú rendszer széles körben elterjedt, és egyre többen kezdték alkalmazni súlyos koponyasérültek várható kimenetelének megítélésére is^{238,286,108}.

E beosztásból kiindulva 2005-ben Maas és mtsai. létrehoztak egy elsősorban a Marshall-féle beosztást alapul vevő, immáron elsődlegesen prognosztikai célzatú pontrendszert, az ún. Rotterdam score-t. Elsősorban a Marshall kategorizálás tömeges laesiokat leíró két - prognosztikai célokra meglehetősen elnagyolt - csoportjának finomabb differenciálásával értek el áttörést, oly módon, hogy pontértéket adtak a kamrába törő vérzésnek, a traumás subarachnoideális vérzésnek valamint az epidurális vérzésnek. Maas nemrégiben Marmarou munkacsoportjával közösen NIH támogatott kutatások adatbázisainak tömegét dolgozta fel, megalkotva az IMPACT-adatbázist, azzal a céllal, hogy azonosítsák a kimenetelre vonatkozó legfőbb tulajdonságokat illetve egy olyan internetes adatbázist hozzanak létre, amely a széles körben elérhető onkoterápiás prognosztikai honlapok mintájára néhány paraméter beütésével értékelhető kimenetel-becslést adhat^{142,147,171,279}.

1.9. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgálatok

Miután Povlishock és munkatársainak fent részletezett vizsgálata kapcsán egyértelművé vált, hogy a DAI nem azonnal létrejövő axonszakadás, hanem egy órák alatt progrediáló folyamat eredménye²¹⁴, a komplex patomechanizmusnak megfelelően több támadásponton is kutatások kezdődtek a károsodás mérséklésére, illetve kivédésére.

A DAI- illetve általában a koponya-agysérülés kórfolyamatának komplexitása, a nekrotikus és apoptoticus enzim-kaszkád egyidejű aktiválódása, a másodlagos károsodás jelensége alapján a terápiás megközelítések általánosságban két utat képviselnek: a több támadásponton ható kombinált kezelés illetve az egyes kórfolyamatok szeletkív blokkolásán alapuló stratégia alkalmazható^{173,212}. A patobiológiai folyamatok pontosabb megismerését az utóbbi, míg a klinikai kezelést az előbbi megközelítés szolgálhatja jobban.

A mitochondriumok funkciójának megőrzésén keresztül az axonok integritását fenntartani képes eljárások vizsgálata (hypothermia, Cyclosporin-A kezelés) segítette a mitochondriális károsodás kóroki szerepére, az apoptoticus enzimek aktiválódásának lehetőségére irányuló további, a jelen disszertáció alapját képező vizsgálatok kibontakozását.

A calpain szelektív gátlására vonatkozó vizsgálatok nemcsak az axonkárosodás kivédésének lehetőségét vethették fel, hanem az eddigi patobiológiai feltételezések helyességét is igazolhatták.

A PACAP mind a nekrotikus, mind az apoptoticus folyamatok közvetett befolyásolása révén lehet axono-protektív hatású, a szelektív PARP-inhibitor pedig szintén a mitochondriumok működőképességének megőrzése útján fejtheti ki a DAI-t gátló hatását.

1.9.1. A mitochondriumok integritása és az axonális energia-háztartás megőrzése

Az axonkárosodás gátlására az első sikeres beavatkozás a feltehetően a mitochondriális energiaháztartás megőrzése és az axolemma stabilizálása révén ható kontrollált hypothermia kezelés volt¹⁴⁴. A contusiós agysérülés állatkísérleti modelljében a trauma után rövid időn belül (<25 perc) alkalmazott terápiás, közepes fokú hypothermia (32°C) szignifikánsan csökkentette az axonduzzadást/ballonképződést mutató axonok számát. A korai kontrollált hypothermia axonális védelmet nyújtó hatása később a diffúz agykárosodást kiváltó modellekben is igazolást nyert mind az axonduzzadás/ballonképződés (APP-pozitivitás)^{119,157}, mind a CMSP és az NFC tekintetében^{29,152}. Ugyanakkor több vizsgálat igazolta, hogy a felmelegedésnek lassú, fokozatos formában kell történnie, a túl gyors visszamelegítés ugyanis az axonkárosodás újbóli felerősödését okozza, mely hatás az immunophillin tacrolimussal (FK506, *ld. lent*) ugyanakkor részben kivédhető^{157,264}.

A terápiás jellegű kutatások egy másik csoportja is a mitochondriumok integritásának megőrzését, ezáltal a lokális energiaháztartás fenntartását, illetve a cytochrome-c (cyto-c) felszabadulásának és a következményes caspase aktivációnak a megakadályozását célozta. Okonkwo és munkatársai egy, a klinikumban már immunszupresszánsként bevált szert, a cyclosporine-A-t (CsA) vizsgálták. E vegyület képes kötődni a MPT-pórushoz (ld. fent), megakadályozva annak kinyílását, ezáltal csökkentve a mitochondriális károsodást¹⁸⁷. A kísérletek igazolták, hogy a mitochondriumok funkciójának fennmaradása esetén az excesszív mértékben beáramló Ca²⁺ eltávolítását végző folyamatok energiaigénye fedezhető, és így a Ca²⁺-indukálta strukturális fehérjebontás fékezhető, következményesen az axonális citoszkeletális elváltozások megelőzhetőek^{31,184}.

Az NFC befolyásolásában megfigyelt jótékony hatás mellett a CsA az intraaxonális transzportzavart mutató axonok számát is szignifikánsan csökkentette^{184,185,187}. A CsA-val kapcsolatos legutóbbi klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a szer emberben is biztonságosan alkalmazható, így lehetőség nyílhat a tényleges klinikai kipróbálásra¹⁵⁹.

Az MPT-pórusokra kifejtett hatása mellett a CsA és számos egyéb, hozzá hasonlóan az immunophillinek családjába tartozó vegyület képes a calcineurin gátlására is. Ismert, hogy a citoszkeleton integritásához elengedhetetlenül fontos a neurofilamentek foszforilált állapotának fenntartása. A calcineurin egy foszfatáz, amely úgy károsítja az axonális citoszkeletont, hogy a neurofilamenteket – defoszforilásuk útján – hozzáférhetőbbé teszi a calpain számára¹⁸⁸, így gátlása jótékonyan befolyásolhatja az axonkárosodás folyamatát^{50,51,230}. Az immunophillinek közül az FK506-ról (tacrolimus) sikerült kimutatni, hogy az axonduzzadást mutató neuritok számának csökkentése révén kedvező hatása van diffúz traumás axonkárosodásra^{148,252} illetve különböző agysérülési modellekben alkalmazott hypothermia kezelés esetén a felmelegedési szakban mind az axonális, mind a neurovascularis károsodást kivédi.

1.9.2. A calpain gátlása

A diffúz axonkárosodás mechanizmusának ismeretében további terápiás lehetőségnek tarthatjuk a calpain enzim- és így a calpain-mediált spectrin proteolízis gátlását. Korábbi, contusiós traumamodellben a calpain gátlásával végzett vizsgálatokban valóban az NFC és a spectrin-degradációs termékek képződésének csökkenését figyelték meg²⁰⁷. A calpain gátlása javította a trauma utáni funkcionális kimenetelt fokális agykárosodás esetén^{228,229}, ugyanakkor e jótékony hatás mögött nem sikerült Western blottal és hisztológiai módszerekkel csökkent CMSP-t kimutatni²²⁹.

Hasonlóan ellentmondásosak az eredmények a diffúz koponyatrauma egér-modelljében, amennyiben ez esetben sem kísérte a javuló neurológiai kimenetelt csökkent neuronális CMSP az agykéregben illetve a hippocampusban¹²⁴.

A calpain-mediált struktúrfehérje-bontásnak a DAI kóreredetében játszott, a disszertációban részletezendő szerepének ismeretében joggal vetődött fel, hogy a calpain antagonisták funkcionális kimenetelre gyakorolt jótékony hatása és a contusiós elváltozások méretének változatlansága közt feszülő ellentmondás oka az e modellekben is kialakuló, ám eddig nem vizsgált diffúz sérülés-, elsősorban az axonkárosodás gátlásában keresendő.

A korábban leírt és sikerrel alkalmazott calpain inhibitorok kereskedelmi forgalomba – különböző okok miatt- nem kerültek. Kísérletes kipróbálásra az MDL-28170 állt

rendelkezésre, melyet az előállító cég ajándékozott a vizsgálatok elvégzéséhez. Az MDL-28170 egy sejt permeabilis peptidil-aldehyd, szelektív calpain inhibitor, mely arteria cerebri media- (MCA-) filament occlusiós modellben már igazolta neuroprotektív hatását. A szer hátránya rossz oldhatósága, s az oldószer következtében kialakuló lágyrész-elhalás lehetősége, mely klinikai kipróbálásának gátat szab¹⁴⁵.

1.9.3. Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) alkalmazása A DAI kórfolyamatában mind a nekrotikus mind az apoptoticus enzim-kaszkád szerepet játszik, ezért azok az eljárások, melyek feltehetően mindkettőt gátolják, kiemelt figyelmet érdemelnek. E kettős támadáspont különösen azért kap hangsúlyt, mert egyes elképzelések szerint az apoptotikus folyamatok gátlása 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 kaszkád aktiválódását, tehát a két enzimatikus folyamat közti "shiftet" idézi elő¹⁴¹ (*ld.fent*).

Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) szerkezetileg a vazoaktív intestinális peptid (VIP)/szekretin/glükagon családba tartozik, melyet először a hypothalamusból izoláltak¹⁶⁷. E fehérjét Miyata és munkatársai húsz éve mint a hypothalamusban termelődő peptidet írták le, mely a hypophysisben az adenylate cyclase aktivitást emeli és neuromodulációs funkciója mellett a központi- illetve a perifériás idegrendszer területén szerteágazó, részben igazoltan neurotrophicus és neuroprotectiv hatást fejt ki^{7,284}. Antiapoptotikus képességét igazolja, hogy a gerincvelő sérülés extradurális staticus compressios modelljében a gerincvelői apoptózis szignifikáns csökkentése¹¹⁶ mellett a gerincvelő átmetszés modelljében kivédte a TNF felszabadulást¹¹⁸ és koponyasérülés kísérletes modelljében a PACAP-mRNA "upregulatio-ja" az apoptoticus sejtek párhuzamos csökkenésével járt együtt²⁵⁴. Mindazonáltal a PACAP pontos sejtszintű hatásai csak részben ismertek.

In vitro mind antiapoptoticus, mind gyulladáscsökkentő hatásait leírták. A kisagy granuláris sejtjeiben szignifikánsan gátolta a caspase-3 aktiválódást²⁸³. Ugyancsak gátolta a microgliális pro-inflammatoricus cytokine és nitrogén oxid felszabadulást^{52,118,121} illetve serkentette az anti-inflammatorikus IL-10 cytokine termelődését⁷⁶. A PACAP több olyan gén "upregulatioját" indítja el, melyek a neurotoxicitás elleni védekezésben szerepet játszanak, ezek közé tartozik a cytochrome P450 és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) regulált fehérje²⁸². A peptid a glutamát transzporter és szintetáz expresszió fokozása révén elősegíti az

astroglia glutamát felvételét⁶². A glutamát indukált toxikus hatások kivédésében játszott szerepét többek közt corticális és retinális neuron-tenyészetben igazolták^{69,169,243}. A PACAP egyik támadáspontja szintén mitochondriális: kísérleti körülmények között gátolta a mitochondriális kalcium felvétel hatására létrejövő akonitáz-inaktiválódást, fenntartva ennek a mitochondriális eredetű, a neuronok működőképességéhez nélkülözhetetlen enzimnek a funkcióját²⁶⁹.

In vivo vizsgálatok alapján igazolódott, hogy a PACAP átjut a vér-agy gáton^{14,256} illetve egyaránt hatásosnak bizonyult patkányban kísérletesen előidézett globális és fokális agyi ischaemia előtt, és után adva, valamint retinális degeneráció esetében is^{8,9}. Viselkedésvizsgálatok alapján kimutatták, hogy Huntington-kór esetében a PACAP-al előkezelt patkányokban hyperkinézia egyáltalán nem alakult ki, s az aszimmetrikus mozgás is megszűnt a kezelés utáni 10. napon²⁷¹. A Parkinson-kór állatkísérletes modelljében a PACAP-al történő előkezelés csökkentette a hypokinézia súlyosságát valamint teljes felgyógyuláshoz és az aszimmetrikus tünetek megszűnéséhez vezetett a kezelés utáni 10. napon²²¹. A peptid diffúz agysérülésben játszott esetleges jótékony szerepéről ugyanakkor a disszertáció alapjául szolgáló kísérletek megkezdéséig semmi nemű adat nem állt rendelkezésre.

1.9.4. A PARP-gátlás

A PARP-ot DNS-javító enzimként ismerték meg. Az (oxidatív-) stressz hatására kialakuló DNS törés indukálja aktiválódását, melynek következményeként a NAD-ról ADP-ribóz egységeket transzferál nukleáris fehérjékre. Ez a rendkívül energia igényes folyamat halmozott stressz hatására kialakuló túlműködésével a NAD deplécióját, ATP vesztést és a sejt energia-homeosztázisának összeomlása révén a sejt halálát eredményezheti³⁴.

Miközben a PARP hosszútávú gátlása elvileg mutagenezist és cancerogenesist indukálhat, az akut szakban hozzájárulhat az energia-háztartás rendeződéséhez, az energiahomeosztázis fenntartásához.

Komjáti és munkatársai a közelmúltban (2005) megállapították, hogy a PARP-gátlás nemcsak a szabadgyök (ROS)-indukálta nekrózist gátolja. Az AIF-en keresztül a PARP közvetlenül szerepet játszik az apoptoticus folyamatok elindításában is és az NF-kappaB-úton keresztül inflammatorikus cytokinek és mediátorok felszabadulását is modulálja¹²⁰.

Az elmúlt években a koponyasérülés különböző modelljeiben számos PARP-inhibtort teszteltek, így a PARP-inhibitor 3-aminobenzanide-ot, mely szignifikánsan csökkentette a hideg-indukálta agysérülés-modellben kialakuló laesio kiterjedését¹⁰⁶.

Érdekes ugyanakkor, hogy hasonlóan a calpain gátlás neuroprotektív hatásához, a PARPinhibíció során sem sikerült eddig minden esetben feltárni a kedvező klinikai hatás patomorfologiai hátterét. A laterális folyadék percussios modellben LaPlaca és munkatársai¹²⁹ igazolták, hogy a PARP inhibitor GPI 1650 szignifikánsan csökkentette a laesio mértékét, anélkül, hogy a TUNEL-pozitív sejtek számát csökkentette volna. Más vizsgálatok javuló funkcionális kimenetelt találtak változatlan méretű sérülés mellett²⁰.

A fenti vizsgálatok nem tértek ugyanakkor ki az LFPI által okozott "járulékos" DAI elemzésére, így a disszertáció alapjául szolgáló vizsgálatok során azt a feltételezést is vizsgálni kívántuk, hogy a morfológiai vizsgálatokkal nem egyértelműen magyarázott kedvező funkcionális kimenetel hátterében állhat-e a DAI gátlására gyakorolt hatás.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

1., Ca²⁺ indukálta proteázok (calpain) aktiválódásának igazolása diffúz axonkárosodást előidéző kísérletes neurotrauma modellben

2., A calpain-mediálta szerkezeti fehérje bontás tér- és időbeli kialakulásának leírása

3., Kolokalizációs vizsgálatokkal meghatározni a calpain-mediálta szerkezeti fehérje bontás és a DAI során kialakuló további kórfolyamatok (axoplazmatikus transzport zavar,

citoszkeletális kompaktálódás) tér- és időbeli viszonyát

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

II. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata - Fehérjebontó folyamatok szerepe a diffúz axonális károsodás kóreredetében II.

5., A diffúz axon-sérülés során létrejövő mitochondriális károsodás fény-és elektronmikroszkópos bizonyítékainak feltárása

6., Apoptoticus folyamatokban szerepet játszó cisztein proteáz-kaszkád (caspase) aktiválódásának vizsgálata diffúz axonkárosodást kiváltó kísérletes neurotrauma modellben különös tekintettel a proteolytikus folyamatoknak a mitochondriális károsodással való összefüggésére

7., A diffúz axonális károsodásban szerepet játszó fehérjebontó folyamatok kapcsolatának tisztázása

III. A diffúz axonális károsodás 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) DAI jelenségének igazolása

10., A gerincvelői DAI és az azt kiváltó, a koponyára ható 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 diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása: a fehérjebontó folyamatok gátlásának vizsgálata

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

14., A szelektív calpain-inhibitor MDL-28170 hatásának elemzése: az axonális membránpermeabilitási zavar gátlásának vizsgálata

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

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

16., A PACAP diffúz axonális károsodást 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 diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolása: az apoptoticus folyamatokat gátló PARP-inhibitor L-2286 hatásának vizsgálata

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-modellek³⁰

3.2.1. Kisállat-narcosis

Műtét előtt a patkányokat egy plexiből készült dobozban 4 % isoflurán (Forane, Abott, Magyarország), 70 % N₂O and és 30 % O₂ keverék segítségével elaltattuk majd 0 méretű Miller laryngoscope lapoc és méretre vágott szilikon tubus alkalmazásával orotrachealisan intubáltuk. A műtét ideje alatt az állatokat folyamatos altatásban tartottuk (1,5-2 % isoflurán, 70 % N₂O és 30 % O₂ keveréke Ohmeda Tec 4 Anesthetic Vaporizer (Ohmeda Inc., Madison, WI) altatógép segítségével (Inspira ASV, Harvard Apparatus, USA). Az állatok szövettani feldolgozása előtt a peritoneum üregébe juttatott natrium-pentobarbitáltúladagolással értünk el szívmegállást ("túlaltatás").

3.2.2. Az élettani paraméterek monitorozása

Annak ellenére, hogy a vizsgálatok során alkalmazott kísérletes modellek világszerte elterjedtek, s érdemi fiziológiai eltérést kontrollált alkalmazásuk nem okoz, a kísérletes neurobiológiai vizsgálatoknál elvárható gondosság biztosítására minden állatkísérlet során monitoroztuk a perifériás oxigén telítettséget és a szívritmust (NONIN Pulse Oxymeter 8600V) illetve a rectális és a temporális izom-hőmérsékletet, miközben az állat testhőmérsékletét a szenzorokkal összekapcsolt fűtőpad segítségével 37°C-on tartottuk (FHC BOWDOINHAM ME 04008 USA Temperature Control). Minden kísérletsorozat alkalmával szúrópróba szerűen kiválasztott állatokon részletes keringés-légzésmonitorozást folytattunk: az arteria femorális heparinizált szilikon-kanülálása után véres vérnyomás monitorozás és rendszeres vérgáz meghatározás történt.

3.2.3.Impakt-akcelerációs koponyatrauma

A Marmarou ás Foda által leírt impakt akcelerációs (IA) koponya trauma modellt^{64,146} (4.*ábra*) a Virginia Commonwealth University (Richmond VA) technológiai intézetéből vásároltuk, Kelet-Európában elsőként. A modell diffúzan elszórt, a koponya sérülés hatására károsodott axonok kialakulását idézi elő elsősorban a hosszúpályák agytörzsi szakaszán (tractus corticospinális (TCSp) medulláris szakasza, a decussatio pyramidorum, lemniscus mediális (LM) és a fasciculus longitudinális mediális (FLM) nyúltvelői szakasza), anélkül, hogy gócos agysérülés, burki vérzés is kialakulna. A műtéti során a patkány fejét Stoelting sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd borotválás és fertőtlenítés után a fejbőrön hosszanti metszést ejtettünk, hogy a Lambda és a Bregma varratok közötti koponyafelszínt szabaddá tegyük. E két varrat közé a középvonalban egy rozsdamentes acélból készült fémkorongot (átmérő: 10mm, vastagság: 3mm) rögzítettünk cianoakrilát segítségével. Ezt



4. ábra. A Marmarou-féle súlyejtéses ("impakt-akcelerációs" /IA/), diffúz agysérülést előidéző készülék fényképe és sematikus rajza.

követően a standard fej-és testtartó szivacsra helyeztük az állatot, ahol szíjakkal rögzítettük, majd az említett fémkorongra 450g tömegű súlyt ejtettünk 2m magasságból a Marmarou-féle IA készülék plexi-csövén át. A koponyasérülés létrehozása után a fémkorongot eltávolítottuk, majd megvártuk, míg a spontán légzés vissza nem tért. Ha a spontán légzés 20 mp múlva sem tért vissza, akkor az állatokat ismét intubáltuk és 100 % O₂-nel lélegeztettük felébredésükig. Koponyacsont-törés esetén az állatot a további kísérletekből kizártuk.

3.2.4. Centrális folyadék-perkussziós koponyatrauma

A Virginia Commonwealth University (Richmond VA) technológiai intézetéből vásárolt készülékkel (*5.ábra*)végzett vizsgálataink során a folyadék perkussziós koponyatrauma



5.,ábra. A folyadék percussios koponyatrauma modell. A: a sérülés előidézésére előkészített patkány a dokkoló egységhez rögzített állapotban, miután a munkahenger légtelenítése megtörtént. B: a kalapács által a cső végén levő gumimembránra mért ütés keltette lökéshullámot az oszcilloszkóp regisztrálja. C: a dokkoló egység (trepanatio utáni) elhelyezkedése centrális folyadék percussios trauma kiváltása esetén.

modellek közül az elsősorban diffúz és kisebb mértékben gócos agykárosodást kiváltani képes centrális módozatot alkalmaztuk, 2atm nyomással, mely e beállítás mellett közepesen súlyos/súlyos sérülés előidézésére alkalmas^{55,265,273}. A patkány fejét Stoelting sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd borotválás és fertőtlenítés után a fejbőrön hosszanti metszést ejtettünk, szabaddá téve a Lambda és a Bregma craniometriás pontokat, melyektől jobbra 1mm-rel két, egyenként 1mm-es fúrt lyukat helyeztünk fel, majd az e célra rendszeresített trepán segítségével a középvonalra helyezett, 4.8mm átmérőjű craniektomiás nyílást készítettünk. Az ún. "injury cap" /a folyadékoszlop "dokkoló" egysége/ és a rögzítő csavarok felhelyezése után a légmentesített folyadékoszlopot csatlakoztattuk a megfelelően elhelyezett patkány koponyáján kialakított "injury cap"-hez. Ezt követően a 2atm nyomásra beállított készülék létrehozta a sérülést: a folyadékoszlopot tartalmazó üvegcső végén levő membránra mért ütést a gumi-végű fémkalapács, a folyadékoszlopon végigfutó lökéshullámot oszcilloszkóp rögzítette, kalibrációs görbe segítségével megadva a nyomás-értéket, amely a craniektomia területén a dura materra tevődött. Ha a beavatkozás során a kemény agyburok sérült, az állatot a további kísérletekből kizártuk.

3.2.5. Tormagyökér-peroxidáz alkalmazása

A tormagyökér peroxidázt (HRP, Sigma Aldrich Hungary) egy órával a koponyasérülés előidézését megelőzően, már altatott és Stoelting stereotaxiás készülékben rögzített koponyájú állatban stereotaxiás módszerrel az oldalkamrába injektáltuk (Stoelting stereotaxiás készülék, Paxinos-Watson stereotaxiás patkány- agy- atlasz, koordináták: a Bregma kraniometriás pont mögött 1mm, laterálisan 1.5mm és az agyfelszíntől 3.5mm mélyen).

3.3. Kísérletes terápiás vizsgálatok

3.3.1. Az MDL-28170 adagolása

Az MDL-28170-et, mely az Aventis Pharmaceuticals ajándékaként állt rendelkezésünkre, egyszeri, farok-vénába adott 30mg/kg bólus-adagban alkalmaztuk. Oldószerként – s egyúttal a kontroll állatok kezelésére is- 1ml vivőanyagot használtunk, mely polyethileneglykol300 és etanol 9:1 arányú keverékéből állt. A fenti adagolást Markgraf és mtsai leírása¹⁴⁵ illetve a szerzővel történt levelezés alapján választottuk. (A szer és vivőanyaga nehezen vihető oldott állapotba, kizárólag ultrahangos kezeléssel ("szonikátor") érhető el a megfelelő injektáláshoz szükséges viszkozitás; többek között ez a negatív tulajdonság magyarázza, hogy az Aventis gyógyszergyár a kedvező kísérletes tapasztalatok ellenére nem fejlesztette tovább e szelektív, sejt permeabilis calpain inhibitorát.)

3.3.2. A PACAP adagolása

A PACAP alkalmazásával végzett első kísérletes terápiás vizsgálat során 125 μg/kg, fiziológiás sóoldatban oldott PACAP-ot adtunk bólusban, intravénásan (i.v.) (v. femoralis kanülálás után), közvetlenül a koponyatrauma kiváltása előtt, míg a kontroll-csoport ugyanilyen dózisú vivőanyagot kapott. Az állatok a koponyasérülés előidézését követően 2 illetve 6 órát éltek a szövettani vizsgálatokra történő perfúziós fixálásig; az alkalmazott adagolást az irodalomban ischaemiás agyi keringészavar ("stroke") kísérletes vizsgálata során leírtak alapján választottuk²⁵⁶.

A vizsgálatok eredménye (a várt terápiás hatás elmaradása) miatt további kísérleteinkben intracerebroventriculáris (icv.) alkalmazással (*ld. fent*) kerültük meg a vér-agy-gátat, 1 μg, 10 μg és 100 μg PACAP-ot illetve vivőanyagát, valamint ál-operált állatokat is alkalmazva. A túlélési idő 2 óra volt.

További, a terápiás ablak meghatározását célzó vizsgálataink során a fenti tanulmány eredményeit szem előtt tartva 100 µg PACAP-bólust alkalmaztunk icv., melyet 5µl fiziológiás

41

sóoldatban oldottunk fel. A PACAP-ot illetve a kontroll állatok esetében az oldószert 30 perccel illetve 1 órával a koponyasérülés kiváltását követően alkalmaztuk, illetve a kísérlet során ál-operált/ál-sérült/ állatokat is használtunk kontrollként. A túlélési idő ezúttal is 2 óra volt.

A centrális folyadékperkussziós koponyatrauma modellben végzett vizsgálatok esetén 100µg PACAP-bólust alkalmaztunk icv., melyet 5µl fiziológiás sóoldatban oldottunk fel. A PACAPot illetve a kontroll állatok esetében az oldószert 30 perccel a koponyasérülés kiváltását követően adtuk be, 2 órás túlélést hagyva a koponyatrauma után.

3.3.3. Az L-2286 PARP-inhibitor adagolása

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Kémiai Intézetében dolgozó Hideg Kálmán Professzortól kapott PARP-gátlóval végzett vizsgálatok során először a dózis-hatás görbét állapítottuk meg, melynek során 30 perccel a trauma után 10, 50 és 100µg L-2286-ot 5µl fiziológiás sóoldatban feloldva a fent megadott koordináták figyelembe vételével elért jobb oldali oldalsó agykamrába bolus-injekció formájában juttattunk be. A túlélési idő az előző vizsgálatok eredményei alapján 2 óra volt.

Ezen dózis-hatás görbe alapján a továbbiakban mind az IHC, mind a viselkedésvizsgálatokban 100µg L-2286/ 5µl fiziológiás sóoldat dózissal dolgoztunk.

3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

3.4.1. Perfúziós fixálás

A kísérleti állatok túlaltatása után thoracotomiás feltárásból az aorta descendenst érfogóval lezártuk, a bal kamrát megnyitottuk, a felszálló aortát kanüláltuk, s azon keresztül az állatot a jobb pitvar megnyitását követően nyomás-vezérelt perfúziós módszerrel (90 Hgmm), fiziológiás sóoldattal (250 ml)-, majd – kezdetben gyors (350 ml) ezt követően lassú (250 ml) cseppszámmal - Millonig-féle foszfát pufferban oldott 4% paraformaldehyde és 0.1% glutaraldehyde keverékével áramoltattuk át. Azon vizsgálatokban, ahol elektronmikroszkópos szövetfeldolgozást nem végeztünk, a glutáraldehydet nem tartalmazó, ugyancsak 4% paraformaldehyd illetve pikrinsav tartalmú Zamboni-féle fixálót alkalmaztunk. Egy órával a perfúziót követően az agyakat eltávolítottuk és ugyanilyen összetételű oldatban, immerziós módszerrel, 16-18 órán át utófixáltuk.

3.4.2. Az agytörzs feldolgozása

Az agytörzs további vizsgálatokra történő feldolgozását elősegítették az alkalmazott modellekkel nyert korábbi tapasztalatok, melyek alapján a DAI várható anatómiai lokalizációja nagy valószínűséggel kiszámítható volt^{240,277}. Ennek megfelelően az immerziós fixálást követően az agyból egy sagittális agyblokkoló eszközben (Braintree Scientific Inc) a középső, 5mm szélességű hasábot, melynek laterális határa a sulcus parolivaris mediális területén, tehát a medulláris pyramistól oldalra helyezkedett el, kimetszettük. Ebből a blokkból coronalis síkban vezetett metszésekkel leválasztottuk a ponstól a felső cervicális segmentumig terjedő részt, s abból vibratommal [Vibratome Series 1000 (Polysciences Inc., Warrington, PA)], agar öntvényben 30-40μm vastag sorozat-metszeteket készítettünk, melyeket "semi-serial" technikával az adott kísérleti tervnek megfelelően úgy rendeztünk el 12-24 csöves szövettenyésztő tálcákban, hogy egy-egy cső reprezentativ módon a feldolgozandó szövetblokk minden területéről arányosan tartalmazzon több mintát is. A szövettenyésztő cső és a feldolgozott terület méretétől függően 4-8 metszet került egy csőbe.

3.4.3. 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 jelfelerősítési illetve érzékenység-fokozási technikák közül a Stone és társai által 1997-ben a beta-amyloid precursor protein (APP) immunreactivitás (-IR) kimutatására kidolgozott mikrohullámú antigén-felerősítési eljárást alkalmaztuk²⁶⁰. A metszeteket nátriumcitrát pufferbe (pH 6.0) helyeztük, majd egy programozható, magnetronnal működő, 900 watt teljesítményű (PELCO 3460; Ted Pella, Redding, CA, illetve pécsi kísérleteinknél PELCo BioWave 34700-230) speciális laboratóriumi mikrohullámú készülékbe helyeztük. Ezeket a számítógéppel szabályozott és ellenőrzött hűtőrendszerrel ellátott mikrohullámú sütőket úgy programoztuk, hogy a citrát pufferben elhelyezett metszetek 2x5 percig, 70%-os teljesítménnyel kapjanak mikrohullámú energia-csomagot, s hőmérsékletük semmi képpen sem haladja meg a 40°C-ot.

3.4.4. Antiszérumok jellemzése (2-3.táblázat)

A disszertációban ismertetendő IHC vizsgálataink során az alábbi elsődleges ("primary") antitesteket használtuk:

Az **Ab38** kódszámú antitestet (Dr. Robert Siman ajándéka, University of Pennsylvania) a spectrin (fodrin) béta alegysége 150-kDa molekulatömegű lebomlási termékének ("spectrin breakdown product", SBDP) NH₂-terminális fragmentuma ellen termeltették, nyúlban^{223,248-250}. Ez a specifikus SBDP kizárólag akkor keletkezik, ha a spectrin molekulát a Ca²⁺ által aktivált, calpain nevű enzim bontja, tehát a SBDP-IR kimutatása kizárólagosan jellemző a calpain aktiválódására ("signature protein")^{198,225,287,290}, ugyanis a caspase-3 hasonló mólsúlyú, instabil hasítási termékét az antitest nem jelöli . Az antitestet mind Western blot módszerrel, mind kimerítéses, IHC technikával tesztelte az előállító és a Cephalon cég is^{207,223,225,250}.

Az **RMO-14** kóddal jelölt, egérben termelt monoklonális antitest (Dr. Trojanovsky, University of Pennsylvania ajándéka) akkor kapcsolódik a neurofilament közepes molekulasúlyú alegységének ("M-subunit") tövéhez ("rod domain"), ha az oldalkarok ("sidearms") korábban lehasadtak (calpain mediált proteolysis) vagy alapvető alaki változást szenvedtek (calcineurin mediált defoszforiláció), s ez által a rod domain-epitópok hozzáférhetővé válnak. Mivel az axoneredési dombtól kezdődően a neurofilament oldalkarok döntően magas szinten foszforiláltak, leszámítva csupán a viszonylag alacsony foszforilációs szintet mutató Ranvier befűződéseket ("nodal region"), az RMO-14 antitest normális esetben az axonokban elhelyezkedő neurofilamentumokhoz nem kötődik (*2.ábra*). Ugyanakkor az immunszérum kötődési képessége illetve az IHC specifikussága tekintetében hasznos adat, hogy a neuronok, melyek a neurofilamentumokat foszforilálatlan formában tartalmazzák, az RMO-14 antitesttel minden esetben, legalábbis enyhe fokban jelöltté válnak, így a vizsgált szövettani metszetben autokontrollként is szolgálnak.

Az antitest alkalmas arra, hogy a DAI kialakulásának korai szakaszában felismerjük azokat a károsodott axonszakaszokat, amelyekben a neurofilament oldalkar-módosulás és citoszkeletális kompaktálódás folyamata – s a társuló egyéb axolemmális és axoplazmaticus változások - a későbbiekben az axon duzzadásához és szakadásához, degenerálódásához vezethetnek^{131,186,195,218}.

Az **APP-** antitest, mely egér eredetű, monoklonális antiszérum, a Boehringer cégtől, majd a Zymed Laboratories Inc.-tól (utóbbi nyúl, polyklonális) került beszerzésre. Az APP vezikuláris formában, a gyors axoplazmatikus transzport útján szállítódik, s az axoplazmatikus transzport károsodása folytán, lokálisan korán olyan szintet ér el, amely IHCval kimutatható, különösen a fent leírt antigén-jelfelerősítési módszer alkalmazásával^{83,94,162,183,196,240-242}.

44



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	Ca2+-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) 1:100ill.(nyúl) 1:500-3000	Béta-amyloid precursor protein felhalmozódás (axoplazmatikus transzport károsodása)	Fénymikroszkópia	(B-) Anti-egér, patkány-kimerített (ló)1:200

A **cytochrome c (cyto-c)** kimutatására szolgáló antitest egér eredetű, monoklonális, a PharMingen állította elő, és kizárólag az extramitochondriálisan elhelyezkedő cyto-c kimutatására szolgál^{72,73}.

Az **SBDP-120 antitest** az agyi spectrin molekulából kizárólag a caspase-3 enzim által kiszakított fragmentum ("signature protein"-"kézjegy-fehérje") kimutatására szolgáló, Kevin K. Wang által kifejlesztett polyklonális csirke anti-szérum.

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-120csirke 1:3000	120-kDa SBDP, caspase-3 eredetű	Rutin FM/EM,	Biot. Anti-Csirke, kecske, 1:400
SBDP-120csirke1:5000	120-kDa SBDP, eredetű	F-FM kettős jelölés, FITC-TSA	Biot. Anti-Csirke, kecske 1:400
Cyto c Ab egér1:2000 PharMing.	Extramitochondrialis cytochromee c	Rutin FM,/EM	Biot. Anti-Egér, horse 1:400
Cyto c Ab egér1:400	Extramitochondrialis cytochromee c	Fluoresc. FM-	594 Alexa- Anti-egér, kecske
PharMingen		kettős jelölés	1:200
p20-Ab, nyúl 1:8000	Aktivált caspase-3	F-FM-kettős jelölés	594 Alexa- Anti-Nyúl, kecske
R&D Syst.			1:200
APP egér1:200	β-Amyloid Precursor Protein,	Rutin FM	Biot. Anti-Egér, horse 1:200
Boehringer	NH ₂ -vég		

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

A **p20 antitest** az R&D Systems által gyártott polyklonális nyúl antiszérum, mely az aktivált caspase-3 szelektív kimutatásával az apoptotikus enzimkaszkád végső végrehajtó enzimjének jelenlétét igazolja.

3.4.5. Szövettani metszetek előkészítése fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiára Az antigén- jel-felerősítés fent leírt folyamatával bezárólag az IHC protokollok teljesen megegyezőek voltak, majd foszfát pufferes mosás illetve - a második szérum termeltetési fajától függően - 10%-os normál ló- vagy normál kecske-szérum/foszfát pufferes (NHS/PBS vagy NGS/PBS), 0.2% Triton-X-100-at (mind Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tartalmazó oldatában történő 35 perces inkubáció következett. Ez a lépés részben a nemspecifikus antigén-kötés leszorítását (normál szérum) részben pedig a membránnak az antigén általi átjárhatósága növelését szolgálta (detergens). Ezután a megfelelő fajú normál szérum 1%-os oldatában való rövid mosás illetve az elsődleges antiszérumban való, 12-16 órás ("overnight") inkubáció következett. Ismételt, normál szérumban való mosás után egy órán keresztül inkubáltuk a metszeteket a biotinilált második antitest fenti táblázatban ismertetett koncentrációjú oldatában (mind Vector, Burlingame, CA), majd újabb mosás után Vector ABC Elite-kit (Vector, Burlingame, CA) 1:100 oldatával csatoltuk a peroxidase enzimet az IHC reakció-láncba. Az immunkomplexet az így kötött peroxidase közvetítésével, hidrogénperoxid és diaminobenzidin (DAB) (mindkettő Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) hozzáadásával tettük láthatóvá, felhasználva, hogy a DAB oxidálódása során barna, tartósan stabil, elektrondenz csapadékot képez.

3.5. Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelölési stratégia

Miközben a fenti protokoll tükrözi a fény- illetve elektron mikroszkópos egyes jelölés menetét, külön szükséges részleteznünk az Ab38 és RMO-14 antitestek kolokalizálására használt különféle kettős jelölési protokollokat. Bár az IHC repertoár sokféle lehetőséget nyújt különböző antigének egyazon metszetben történő kimutatására sejttesten belül vagy szinaptikus kapcsolatban ("juxta-pozíció azonosítása), különböző epitópok egyazon axonon belül történő egyidejű megjelenítése számos nehézségbe ütközik. Ilyen feladatra a látszólag leghasználhatóbb metodika a fluorescens kettős jelölés, ám ennek elektron mikroszkópos konverziója igen munka- és eszközigényes feladat. A speciális konverziót nem igénylő, elsősorban peroxidase alapú színreakciókkal szintén vannak nehézségek. Munkánk során

számos chromogén kombinációval próbálkozva megerősíthetjük, hogy a rendkívül körülményes protokoll követését igénylő, nehezen diffundáló benzidindihydrochloride [BDHC, zöldeskék, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)]^{37,127,135}, mely ugyanakkor igen jól elkülöníthető, vagy a könnyebben diffundáló, ám fénymikroszkópos szinten nehezebben megkülönböztethető Vector VIP (VVIP, lila)^{92,299} egyaránt alkalmazható akár egymással, akár a DAB-bal (barna) párban, két, eltérő epitóp egyazon metszetben történő megjelenítésére és azonosítására.

Kísérleteinkben az Ab38 és RMO-14 kolokalizálására először a fentiekben leírtaknak megfelelően a metszeteket az Ab38 antitesttel inkubáltuk és a reakciót DAB-bal hívtuk elő. Ezután a metszeteket foszfát pufferben mostuk, majd 10%NHS-ben blokkoltuk, mely ezúttal már nem detergenst, hanem 1:20 arányban higított Vector Avidin Blocking Kit-tet tartalmazott. Ezt 1% NHS-ban történt rövid mosás, majd az RMO-14 – antitestben való 12-16 órás inkubáció követte. Az RMO-14 1:500 hígítású oldata tartalmazott még 1:20 arányban oldott Vector Biotin Blocking Kit-tet is. Az inkubációt követő, 1% NHS/PBS-ben történő mosás után a metszeteket a második szérummal inkubáltuk, majd századmólos, 7.5 pH-jú foszfát pufferben mostuk, Vector ABC oldatban inkubáltuk, és a VVIP peroxidase szubsztrát-kit 1:60 hígítású oldatában előhívtuk. A metszetek egy részét a fenti összetételű pufferból vittük tárgylemezre, és tartós alkohol-behatás elkerülésével lefedtük (Cytoseal 60, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), más metszetek pedig a későbbiekben leírandó módon EM feldolgozásra kerültek.

Azokban az esetekben, ahol a BDHC – VVIP chromogén kombinációt alkalmaztuk, a két antigén kimutatása a fentieknek megfelelő szekvenciában történt, azzal a különbséggel, hogy az első immunreakció, tehát az Ab38 kimutatására a BDHC-t alkalmaztuk. Ez a protokoll megkövetelte továbbá, hogy a metszeteket 6.5 pH-jú, 0.01M foszfát pufferben mossuk és az előhívási reakció 4 C°-on történjen. Mindemellett, a BDHC reakcióterméknek a további lépések során történő intenzitás-csökkenését kivédendő, a kettős jelölési folyamat további lépéseit, tehát az RMO-14-ben való inkubálást, illetve az RMO-14-kimutatás VVIP-ben történő előhívásának teljes folyamatát a fenti pufferben és hőfokon végeztük. A VVIP reakció leállítását követően a metszetek további sorsa megegyezett a DAB - VVIP kombináció esetében leírtakkal.

47

3.5.1. Immun-elektronmikroszkópiai szövetfeldolgozás

Az elektron mikroszkópos (EM) vizsgálatokra, ultrastrukturális analízisre kiválasztott szabadon úszó metszeteket osmium tetroxidos impregnálás, felszálló alkoholsorban való víztelenítés után plasztik lemezek között műgyantába (Ted Pella, Redding, CA) ágyaztuk, majd a beágyazást követően a vizsgálandó, IR területeket kivágtuk és plasztik tönkökre ragasztottuk. Az így elkészített szövetblokkokból LKB Ultratome-mal 70-100 nm ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket Formvar-ral bevont mikrorácsokra (grid) terítettünk s két percre 50% methanolban oldott 5% uranyl acetáttal, majd egy percre 0.5% ólomcitráttal kezeltünk. Ezt a kontrasztosítási lépést több metszet esetében elhagytuk. A metszeteket végül egy JEOL-1200 elektron mikroszkópon analizáltuk, a felvételeket pedig transzparencia adapterrel felszerelt Epson-800, Professional Series lapscanner-rel, Adobe Photoshop 5.0 programmal digitalizáltuk.

A Vector VIP –t tartalmazó metszetek esetében a kioldódást elkerülendő a víztelenítés, beágyazás folyamatában a Zhou és Grofova által leírt módszertant alkalmaztuk^{92,299}.

3.6. Speciális kettősjelölési metodika – Tyramide-jelfelerősítés (TSA)

A 30µm vastagságú, vibratommal készített szabadon úszó sorozatmetszetek előkészítése mindenben megfelelt a fentiekben leírtaknak, beleértve a kontrollált hőmérsékleten történő, mikrohullám-indukálta antigén-jelfelerősítés módszerét is.

3.6.1. Immunfluoreszcencia EM-ra konvertálása TSA-val

A mikrohullámban történt kezelés után a metszetek 35 percre 0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical; St Louis, MO) feltárásra kerültek a háttér-blokkolást szolgáló 10%-os normál kecske- és szamár szérum keverékében (NGS és NDS), foszfát pufferban (PBS). Gyors, 1% NGS/NDS tartalmú PBS oldatban történő mosások után a metszeteket az Ab38 és RMO-14 elsődleges antitesteket egyaránt tartalmazó oldatban inkubáltuk éjszakán át (12-16 óra). A nyúl polyklonális Ab38-at 1:18,000, az egér monoklonális RMO-14-et 1:500 hígításban alkalmaztuk. Újabb mosások után coumarin /kék/ jelölt szamár anti-egér immunglobulin (1:200; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) és biotinjelölt kecske anti-nyúl immunglobulin (1:400; Vector, Burlingame, CA) keverékében 60 percig inkubáltuk a metszeteket, majd PBS-ben mostuk őket. A metszet-előkészítés minden további lépése sötétkamrában, közvetlen fényhatás kerülésével történt.

A TSA alkalmazását egyszerűsítendő s egyszersmind az eljárás költségeit csökkentendő, illetve az ultrastrukturális részletek megőrzésének javítására több ponton módosítottuk az elsősorban gyenge IHC jel felerősítésére kidolgozott gyári módszertant (eredeti leírás: használati utasítás, Renaissance Kit, NEN Life Sciences Products, Boston, MA). Összefoglalva, az avidin-biotin-peroxidáz komplexben (ABC standard Elite kit; Vector; 1:200) és TNB blokkoló puffer-oldatban (Renaissance Kit, NEN Life Science) való 20 perces- illetve PBS-ben 2x10 perces mosás után rhodamine-tyramide és biotin-tyramide (Renaissance Kit, NEN Life Science) 1:300- as oldatát alkalmaztuk. Az amplifikációs oldat 1:6 arányú keverékét (Renaissance Kit, NEN Life Science) és PBS-t használtunk a tyramide törzsoldat feloldására, így készítettük el a "munka-hígítást". Ezt közepes méretű szövettenyésztő tálca csöveiben helyeztük el, 400ml munkahígítást és 6 metszetet juttatva minden nyílásba (12 nyílás/tálca, Falcon Multiwell Tissue Culture Plate, Becton Dickinson Labware; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). A metszeteket 12 perc inkubálás után 3x10 percig mostuk PBS-ben. (Az eredeti leírás szerint töményen használandó amplifikációs hígító PBS-ben hatszorosára hígításával és az eredetileg javasolt Tween-20 detergensnek a mosó-pufferekből való kihagyásával az EM-vizsgálatokat hátrányosan befolyásoló membrán károsodás és a feleslegesen magas háttér-immunreaktivitás kivédése volt a célunk.)

A prémium-lemezekre (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA) húzott metszeteket 50% glycerolbidesztillált víz oldatát felhasználva fedtük le, majd azonnal a Nikon Eclipse E 800 kutató mikroszkóp alá helyeztük, ahol Sony Catseye digitális kamerával az immunfluorescens axonokat lefényképeztük, a felvételeket digitálisan archiváltuk. Mivel minden metszetet külön húztunk fel sorozatszámmal ellátott tárgylemezekre, a metszetek követése nem jelentett gondot. A fénykép elkészültével a metszeteket a fedőlemezt leoldva eltávolítottuk és avidin– biotin–peroxidáz 1:200 hígítású oldatában inkubáltuk, majd 0.05% diamino-benzidine (DAB) (Sigma) és 0.01% hidrogénperoxid 0.1M PBS-ben oldott előhívó oldatába helyeztük. (Az eredetileg használt ABC komplex peroxidáza önmagában az EM-feldolgozásra alkalmatlanul gyenge jelet adott az elővizsgálataink szerint, ezért volt szükség az ABC-inkubáció ismétlésére.)

3.6.2. Ultrastrukturális vizsgálatok

A korábbi szakaszokban leírt víztelenítés és beágyazás után a digitális felvételeket elemezve választottuk ki az EM alatt vizsgálni kívánt területeket. A fluorescens illetve fénymikroszkópos felvételekkel való összehasonlításhoz felhasználtuk az utóbbiakon látható

49

speciális azonosítókat, mint például érátmetszetek, szövet-szél, jelölt axonok egymáshoz való távolsága. Az azonosított IR axonszakaszok kerültek további- a fentiekben leírtaknak megfelelő- részletes EM feldolgozás utáni elemzésre JEOL-1200 transzmissziós elektonmikroszkópon.

3.7. Immunfluorescens kettős jelölési technikák (3.táblázat)

A szenzitivitás növelésére és az antitest felhasználás csökkentésére a tyramide signal amplification (TSA) módszert alkalmaztuk^{109,280} a hagyományos fluorescens IHC módszerekkel karöltve.

A korábbiakban részletezett, alapvető IHC szövet feldolgozási és inkubációs lepések, mikrohullám-kezelés, blokkolás és Tritonos membrán-feltárás után a metszeteket éjszakán át inkubáltuk az alábbi oldatok/kombinációk valamelyikében:

(1) Ab38 (nyúl, polyklonális, 1:6000) és cyto-c (egér, monoklonális, 1:300);

(2) cyto-c (egér, monoklonális, 1:300) és SBDP-120 (csirke, poliklonális, 1:5000);

(3) SBDP-120 (csirke, poliklonális, 1:5000) és Ab38 (nyúl, poliklonális, 1:1000); valamint

(4) **SBDP-120** (csirke, poliklonális, 1:5000) és **p20** (nyúl, poliklonális, 1:500).

A másodlagos antitestek alkalmazása és a TSA-jelölés kizárólag sötétkamrában történt. Ennek során az alábbi kombinációkat alkalmaztuk:

(1) biotin-jelölt anti-nyúl kecske Ig (Vector Laboratories) és Alexa 594 fluorescenciával jelölt anti-egér kecske Ig (1:200, 1% NGS-ben hígítva; Molecular Probes, Eugene, OR), majd inkubáció Vector Laboratories ABC kit (1:100)-ben, végül Fluorochrome–TSA-kit (FITC-TSA, 1:200) kezelés;

(2) Alexa 594 fluorescenciával jelölt anti-egér kecske Ig (Molecular Probes) és biotin-jelölt anti-csirke kecske Ig (1:200, 1% NGS -ben higítva; Vector Laboratories), majd inkubáció Vector ABC kit (1:100) -ben, végül Fluorochrome-TSA-kit (FITC-TSA, 1:200) kezelés;

(3) biotin-jelölt anti-csirke kecske Ig (Vector Laboratories) és Alexa 594 fluorescenciával jelölt anti-nyúl kecske Ig (1:200, 1% NGS -ben higítva; Molecular Probes), majd inkubáció
Vector Laboratories ABC kit -ben (1:100), végül Fluorochrome–TSA-kit (FITC-TSA, 1:200)
–ben történő kezelés; és végül

(4) biotin-jelölt anti-csirke kecske Ig (Vector Laboratories) és Alexa 594 fluorescenciával jelölt anti-nyúl kecske Ig (1:200, 1% NGS -ben; Molecular Probes), majd inkubáció Vector

Laboratories ABC kit (1:100) -ben, végül Fluorochrome–TSA-kit (FITC-TSA, 1:200) -ben történő kezelés.

Legvégül, a metszeteket zselatin lemezre húztuk, és Gel/Mount-tal (Blomeda Corp., Foster City, CA) fedtük, a fedőlemezeket körömlakkal légmentesen zártuk. A metszetek további vizsgálata a megfelelő fluorescens szűrők alkalmazásával Sony Catseye digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse 800 kutató mikroszkóp alatt történt.

3.7.1. IHC kontrollok

A vizsgálatok során felhasznált antitestek mindegyike széles körű elemzésen esett át, melyet részben a gyártók, részben pedig a korábbi felhasználók végeztek el^{131,225,207}. 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-higításos kezeléseket is alkalmaztunk.

3.8. Hisztokémia: HRP-kimutatás

A feltételezett axolemma- károsodás miatt HRP-t felhalmozó axonszakaszok kimutatására a fent leírtak szerinti transcardiális perfúzióhoz 2% paraformaldehyde és 2.5% glutaraldehyde 0.1 M Millonig- pufferben képzett oldatát használtuk. Az agytörzs szokott módon történő előkészítését követően 50-µm-es vibratom metszeteket készítettünk, és a szövetekben kötött peroxidázt a kobalt-glükóz-oxidáz módszerrel tettük láthatóvá^{195,219}. Ennek során a metszeteket 37°C-on 0.05% DAB, 0.2% -D-glucose, 0.04% ammónium klorid, és "glucose oxidase type II" (0.41 mg/100 ml) 0.1 M Millonig pufferen képzett oldatában inkubáltuk kétszer egy órán át. A metszeteket üveglemezre húztuk, szárítottuk, alkohol-xilol fürdőben derítettük, majd fénymikroszkópos vizsgálatra alkalmas fedőlemezzel fedtük.

3.9. Az eredmények feldolgozása

3.9.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka

A foszfát pufferből lemezre húzott metszetek víztelenítése és lefedése után azokat egy Sony Catseye digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse 800 (illetve Pécsett SPOT-RT kamerás NIKON 600) photomikroszkóppal elemeztük, a digitális felvételeket Adobe Photoshop programmal rögzítettük, a papírképeket Sony printeren nyomtattuk ki.

3.9.2. Kvantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika

Az eredmények kvantitatív feldolgozása minden kísérlet során vak módszerrel történt, a vizsgált minták eredetét illetően tájékozatlan közreműködő bevonásával. A vizsgálatokat Olympus BH-2 Microscope, Nikon digitális kamera és a hozzá kapcsolt, számítógép-vezérelt képelemző rendszer segítségével (Imaging Research, St. Catherine's, Ont. Canada) valamint Pécsett NIKON Eclipse 600 és hozzá kapcsolt SPOT Diagnostic Instruments Inc. SPOT-RT 2.2.1 kamera és NIH IMAGE J, UTHSCSA-IMAGETOOL 3.00, valamint IMAGE-PRO PLUS 5.0.1 képelemző programok alkalmazásával végeztük.

3.9.3. Statisztikai módszerek.

A károsodott axonok denzitás (mm²-re vonatkoztatott jelölt axon-szám) értékeinek kvantitatív összehasonlítására SPSS 7.5 for Windows szoftver alkalmazásával, Scheffe-féle post hoc többváltozós analízissel kiegészített ANOVA segítségével került sor, a szignifikáns különbség határértékét p<0.05-ben határoztuk meg.

Az axolemma károsodás következtében HRP-t felvevő axonok hosszának és vastagságának elemzése során Student-t tesztet használtunk.

A kísérletek során több protokollt alkalmaztunk:

A CMSP időbeli lefolyásának elemzésére a decussatio pyramidorum területéről választottunk metszeteket s e területről nyertünk digitális felvételt 20X objectiv és 2.5X intermedier lencse alkalmazásával. A képelemzést egy olyan, 125,000 μm² területű négyszögre korlátoztuk, amelynek hossztengelye a lemniscus mediális lefutásával volt párhuzamos, caudális, vertikális axisa a decussatio leg-rostralisabb rostjain haladt át, s maga a négyszög egyenlő felszínt fedett be mind a medulláris pyramisból mind pedig a LM-ból. E területen belül megjelöltük mindazon immunreaktív axonszegmentumokat, melyeknek bármely átmérője az öt mikrométert meghaladta, majd a jelölt, Ab38-IR axonszakaszokat leszámolva, az Ab38-IR axonok denzitását mint reaktív axon per négyzetmilliméter számoltuk, illetve fejeztük ki, s e denzitás értéket használtuk a további statisztikai számításokhoz.

A mitochondriális károsodás -, illetve a calpain- valamint caspase – közvetített axonális szerkezeti fehérjebontás immunhisztokémiai jeleinek quantifikálása során a rendszerezetten ("semi-serial") gyűjtött metszetekből a fent leírt lencsékkel a medulláris pyramis területén meghatároztuk a pyramis craniális ("A") és caudális ("B") végpontja közti "d" távolságot, melynek középső és disztális harmada határán centráltuk a mikroszkóp lencséjét a corticospinális tractusra (CSpT). Ezt követően 20-as objektívre váltva e területről

52

digitális képet készítettünk, majd ugyanezen metszetről a "B" pont magasságában a fasciculus longitudinális mediális (MLF) területéről is készítettünk ugyanezen objektívvel felvételt. A fentiekben hivatkozott digitális képelemző rendszer segítségével történt a képek további feldolgozása: mind a CSpT, mind az MLF területére egy 100,000 μ m² (200x500) rácsot vetítettünk, és a már hivatkozott kizárási küszöböt meghaladó méretű, immunpozitív axonprofilokat manuálisan megszámoltuk, a további feldolgozás pedig a fent leírtak szerint történt.

A koponyasérülés kiváltotta gerincvelői axonkárosodás elemzésekor a medulláris pyramis területén két, egyenként 40.000 μ m^{2—}es rácsot vetítettünk a NIKON 600-as mikroszkóp és SPOT-RT 2.2.1 digitális kamera (SPOT Diagnostic Instruments Inc.) segítségével 50x-es nagyításon felvett képre, (NIH IMAGE J és UTHSCSA-IMAGETOOL 3.00) s a fenti kizárási kritériumok mellett az összes immunpozitív axon-profilt leszámoltuk, míg az MLF területén egy 25X-ös nagyításon felvett képre vetülő 160.000 μ m²-es rácsban végeztünk hasonló számolást. Ugyanezt végeztük el a C1 szegmentum területén is. A C-Th. átmenet területén állatonként hat, rendszerezetten gyűjtött metszetben a 2µm-nél nagyobb átmérőjű axon-profilokat számoltuk meg egy 160.000mm²-es rácsban, melyet úgy vetítettünk a digitális fényképre, hogy a legtöbb károsodott axont foglalja magában. A Th-L. területen hasonló módon jártunk el, itt azonban nem a fenti régióknál alkalmazott, fent leírt denzitásmeghatározási módszert követtük, hanem –az immunreaktív axonok alacsony száma miatt- az egy adott rácsban detektált összes jelölt axon számát határoztuk meg.

A kísérletes terápiás vizsgálatoknál (MDL-28170, PACAP, PARP-inhibitor) hasonló módon jártunk el (csupán az alkalmazott rács méretében volt eltérés az egyes kísérletek során); az MDL-28170-re vonatkozó kísérletek esetében a permeabilitási vizsgálatoknál meghatároztuk a kijelölt rácsba eső HRP-jelölt axonok átlagos hosszát, vastagságát minden egyes kísérleti állat esetében.

3.10. Viselkedésvizsgálatok

3.10.1. Egyensúlyozás teszt

Az egyensúlyozás teszt (beam-balance teszt) a finom-motoros koordinációbeli károsodások vizsgálatára létrehozott módszer, amellyel a betegek olyan mindennapi tevékenységét lehet rágcsálókon kísérletesen utánozni és vizsgálni, mint a járás és egyensúlyérzet. A mozgás koordinálásában az asszociációs kéreg, a szenzomotoros kéreg, a törzsdúcok, a kisagy, az agytörzs valamint a gerincvelő egyaránt részt vesz. Neuronális szinten a vesztibulo-motoros

funkciókat a corticospinális neuronok, a nigrostriális neuronok, a nucleus accumbens, a bazális ganglion és a thalamusz közvetíti⁹⁹. Ha ezek közül valamelyik rendszer károsodást szenved, akkor a motoros funkciókban zavar lép fel.

Vizsgálataink során a műtét előtt 1 nappal minden egyes kísérleti állatot addig kondicionáltuk, amíg képesek lettek az egyensúlyukat három egymást követő próbálkozás során 60 mp-ig megtartani egy 1,5-2cm szélességű fából készült gerendán, amit 60cm magasságban helyeztünk el egy szivacspárna felett. Minden állatot a trauma után naponta egy alkalommal teszteltük (trauma után 1órával majd naponta, azonos időben 1x a 7. nappal bezárólag). Az állatokat a vizsgálat után a Clifton és mtsai által meghatározott értékelés alapján pontoztuk⁴⁵: 1, egyensúlyi helyzetet vesz fel és azt meg is tartja; 2, megfogja a gerenda két oldalát és/ vagy egyenetlen mozgást végez; 3, a gerendába kapaszkodik leesés nélkül; 4, megpróbál egyensúlyozni, de leesik; 5, függeszkedni próbál, de leesik; 6, egyáltalán nem képes fent maradni a gerendán, leesik.

A vizsgálat kiértékeléséhez az egyes vizsgálati csoportokba tartozó állatok napi eredményeit átlagoltuk, majd az egyes csoportok átlagát számoltuk, és statisztikai hipotézisvizsgálatokat végeztünk a csoportátlagok összehasonlítására.

3.10.2. Emelt keresztpalló teszt

A különböző súlyosságú koponyasérülés után gyakran lép fel kisebb-nagyobb mértékű szorongás vagy depresszió^{39,71,113,143}. Az emelt keresztpalló teszt (elevated plus maze test, EPM) a szorongás mértékének vizsgálatára alkalmas vizsgálati módszer.

A berendezés 2-2 egyforma hosszúságú karból (45cm hosszú, 10cm széles) áll, amelyek egy pontban (középen) találkoznak. A zárt karokat 3 oldalról 30cm magas fal veszi körül, míg a nyitott karokat nem övezi fal.

A nyitott, illetve zárt karban eltöltött idő aranyának, valamint a nyitott karba való belépések számának változása alapján lehet következtetni a szorongás mértékére, alakulására¹⁹³. Salum és mtsai²³¹ szerint a sérülést nem szenvedett állatok ebben a tesztben közepes szorongási szintet mutatnak, vagyis előnyben részesítik a védettséget nyújtó zárt kart.

Állatkísérletes vizsgálatainkban az emelt keresztpalló tesztben a trauma után fellépő szorongást vizsgáltuk a trauma utáni 6. napon. Az állatokat egyesével a berendezés közepére helyeztük. Egy, a kísérlet szempontjából tájékozatlan ("vak") megfigyelő videokamera segítségével rögzítette az 5 perces időintervallum alatt az egyes állatok tevékenységét. A kiértékelés során az alábbi paramétereket vizsgáltuk: fej-bedugások száma a nyitott karba,

belépés mindkét mellső lábbal a nyitott karba, ágaskodás a nyitott illetve a zárt karban, nyitott illetve zárt karban töltött idő, szőrtisztító magatartás (ld. a porond tesztnél) a zárt karban.

3.10.3. Porond- teszt

A motoros funkciók vizsgálatára létrehozott, leginkább standardizált, általános módszer az porond (open field) teszt. Ebben a tesztben lehetőség nyílik a spontán mozgások (lokomotoros aktivitás) mennyiségi változásának nyomon követésére. A lokomotoros aktivitás alatt mind a megtett utat (crossing, horizontális mozgások), mind a sztereotip ágaskodásokat és a mosakodó/szőrtisztító magatartást (rearing, grooming, vertikális mozgások) értjük. Maga a vizsgálati mező egy 50cm magas falú és 70X70 cm alapterületű, és egy 4x4-es négyzetrácsos térrészre osztott, álló alapú faláda. A kísérleti állatokat a sérülés utáni nyolcadik napon szállító ketrecben vittük a vizsgálati helyiségbe, ott 30 percig tartottuk őket ketrecükben (szoktatás az új környezethez), majd az open field apparátus közepébe helyeztük az állatokat egyenként. Az 5 percig tartó teszt során videó kamera segítségével rögzítettük a kísérleti állatok mozgását, majd az elemzés során, az egyes négyzeteken való áthaladások (minimum 3 láb egy négyzetben jelent 1 "crossing"-ot), és a mosakodások valamint ágaskodás számát megállapítottuk. Ezután csoportátlagokat képeztünk és statisztikai összehasonlításokat végeztünk.

3.11. 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-, az alkalmazott protokollok auditálást szolgálja. A rendszerbe 2009. december végéig 341 súlyos koponyasérült adatai kerültek. Ezen adatok egy része klinikai információ, mely a Klinika Intenzív Osztályán rögzített élettani adatokat (Philips Intelliview MP40 monitor-rendszer adatai 72 óránként letöltve központi monitorról, 5 perces intervallumokban: ICP, MABP, invazív BP, HR, EKG, SatO₂), továbbá GCS, GOS, agyi oxigén és szöveti hőmérséklet (Licox) illetve agyi vérátáramlás (Hemedex), Astrup értékeket tartalmaznak.

A PTE ÁOK, majd KK Regionális Kutatásetikai Bizottság illetve az US Department of Defense folyamatos ellenőrzése illetve engedélye alapján az abba beleegyező betegek/hozzátartozók esetében rendszeres szérum és liquor-mintavétel történik (utóbbira a külső kamrai drain indikációjának standard ellátási protokoll szerinti felállítását követően

kerülhet sor), a CT és MRI vizsgálatok archiválása mellett a mikrobiológiai tenyésztések eredményét is tartalmazza az adatbázis.

Emellett az elbocsátott betegek rendszeres visszarendelése, a túlélők kognitív tesztbattériával való követése illetve endokrin követéses vizsgálatok képezik a rendszer további elemeit.

3.11.1. Liquorminták elemzése

Klinikai vizsgálatainkat a PTE ÁOK, majd KK Regionális Kutatásetikai Bizottságának (Institutional Review Board) illetve az US Department of Defense engedélyével a Helsinki Deklaráció (Good Clinical Practice) elveinek teljes betartásával végeztük. A vizsgálatokba bevont betegek kezelésének és neuro-monitorozásának menete minden vonatkozásban megfelelt a klinikai rutin ellátást meghatározó protokolloknak. A vizsgálatokba bevont betegekből az agyvíz mintát az érvényes ellátási irányelveknek megfelelő kezelésük részeként szükségessé váló beavatkozások (külső kamrai drainage, lumbális punkció) során nyertük.

Tizenkét súlyos koponyatraumát (GCS <9), 3 subarachnoideális vérzést (SAV) illetve 3 intraventrikuláris vérzést (IVV) szenvedett, továbbá 3 agytumoros beteg – ICP kontroll céljából behelyezett agykamrai katéteren keresztül lebocsátott – liquor-mintáin, illetve 5, meningitis vagy sclerosis multiplex kizárására negatív eredménnyel diagnosztikus-célú lumbál-punkción átesett beteg liquor-mintáin a calpain- és caspase-specifikus SBDP-k kimutatására Western blottot végeztünk. A kapott eredményeket denzitometriás módszerrel hasonlítottuk össze. Néhány beteg esetén e kóros fehérjék jelenlétét a liquorban a traumától eltelt idő függvényében is meghatároztuk.

A kamrai katéteren keresztül vagy lumbál-punkcióval nyert liquor-mintákat a calpainés caspase-specikifus SBDP-k kimutatására dolgoztuk fel. A mintákat 100kD-s szűrőt használva Amicon ultrafiltrációs készüléken átszűrtük, majd a fehérje-koncentrációikat fotometriás módszerrel megmértük. A 20µg fehérjét tartalmazó mintákkal 6.5 %-os gélen nátrium-dodecil-szulfátos polyakrilamid gél-elektroforézist végeztünk, majd a gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat az alfa-II spectrint és lebontási termékeit egyaránt kimutató (éppen ezért immunhisztokémiai vizsgálatokra nem alkalmas) MAB1622 egér antitesttel (Chemicon, 1:5000), majd biotinilált anti-egér másodlagos antitesttel (1:1000), végül streptavidin-biotinilált peroxidáz komplexben inkubáltuk. Az immunjelölést kemilumineszcens reagens segítségével Kodak filmeken tettük láthatóvá. Az eredményeket denzitometriás módszerrel értékeltük és t-próbával hasonlítottuk össze.

3.11.2. Prognosztikai Vizsgálatok

Vizsgálatunkban a klinika súlyos koponyasérült adatbázisának elemzése során 99 súlyos koponyasérült (post-resuscitatiós GCS 8 vagy az alatti) CT vizsgálatait és túlélési adatait vetettük egybe. Negyvenhat esetben hagyományos CT felvételek kiértékelésére volt lehetőség, 53 alkalommal digitális képek számítógépes analízise történt DicomWorks 1.3.5 szoftverrel. Minden esetben a kórházba kerülés utáni – súlyos koponyasérültekről rutinszerűen készülő – legelső CT vizsgálat felvételeit tanulmányoztuk, hogy ily módon elkerüljük a másodlagosan kialakuló és az esetleges sebészi tevékenység következtében létrejövő elváltozások zavaró hatását. A Marshall-féle beosztás valamint a Rotterdam score megállapításán túl számos további, klinikai tapasztalatok szerint a koponyaűri nyomásfokozódás indirekt jeleként értelmezhető elváltozást elemeztünk. Ilyenek voltak többek között: contusiós vérzés; oedema részleges/generalizált; epidurális vérzés; impressiós törés; intracerebrális vérzés; kamrába törő vérzés; petechiás vérzés; subarachnoideális vérzés; subdurális vérzés; ciszterna kompressziója/hiánya; középvonal eltolódás; plexus choroideusok és corpus pineale szimmetriája. Dicommal elemezhető eseteinknél emellett vizsgálatra került a contusiós vérzés térfogata (cm³); epidurális vérzés térfogata (cm³); intracerebrális vérzés térfogata (cm³); subdurális vérzés térfogata (cm³); vérzések össz-térfogata (cm³). Adataink statisztikai feldolgozásához egy-, illetve többparaméteres logisztikus regressziót alkalmaztunk SPSS 11.5 szoftver segítségével.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

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

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

Vizsgálatunk célja a Ca²⁺ beáramlás- kiváltotta CMSP IHC kimutatásán keresztül annak kiderítése volt, hogy pontosan milyen szerepet játszhat a Ca²⁺ kiváltotta strukturális proteolízis a DAI patogenezisében. Az általános elméleti bevezetőben leírtaknak megfelelően feltételeztük, hogy a koponyasérüléskor ébredő nyíróerők hatására létrejövő kezdeti membránpermeabilitás-változás (axolemmális mechanoporáció) hatására az axonba Ca²⁺ áramlik, mely a CMSP aktiválódásához és következményes citoszkeletális fehérje-emésztődéshez vezet. Mint azt korábban szintén leírtuk, arra számítottunk, hogy egy azonnali, kontrollálatlan fehérje-emésztés helyett a CMSP-IR fokozatosan aktiválódik, s ennek megfelelően mind az IHC-val detektálható axonok mennyisége mind pedig az egyes axonokon belüli ultrastrukturális folyamatok időben progressziót mutatnak. A vizsgálatok fontos részét képezte annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a Ca²⁺-indukálta CMSP IHC valóban kolokalizálható-e a DAI-ban korábban leírt klasszikus markerekkel, azaz a CMSP és a DAI megjelenése és progressziója térben és időben összekapcsolhatók-e.

A vizsgálatokat összesen 24 patkányon végeztük: IA-sérülést alkalmaztunk 15, 30, 60 és 120 perc túlélési idővel, túlélési időnként 6 állatot operáltunk, ebből 1-1 traumát nem szenvedett, de a műtéti fázisokon (altatás, fémkorong-felhelyezés, trauma-készülékben történő pozícionálás, ébresztés) átesett kontroll volt ("sham control"). A szövetfeldolgozás az általános metodikai fejezetben leírtaknak megfelelően zajlott, a sorozat-metszeteket hat csoportba gyűjtöttük ("semi-serial sections"), Ab38 egyes jelölést alkalmaztunk fény- illetve elektron mikroszkópiára (egyes és kettes csoport), RMO-14 egyes jelölést fény-és elektron mikroszkopiára (hármas és négyes csoport) és a korábban részletezett módon, kétféle peroxidase alapú színreakcióval előhívott Ab38-RMO-14 jelölt metszeteket dolgoztunk fel fény- (ötös csoport) és elektron mikroszkópiára (hatos csoport). Az egyes és hármas csoportból retrospective minden olyan metszetet, amely a pyramispálya kereszteződését tartalmazta, a metodikai fejezetben leírt módon kvantitatív elemzésnek is alávetettünk.

E jól karakterizált és széles körben használt impakt-akcelerációs TBI modellt alkalmazva sikerült kimutatnunk a Ca²⁺-indukálta cisztein proteáz, a calpain aktiválódását annak spectrin-hasító tulajdonságát felhasználva- a patkány corticospinális pályája pyramidalis szakaszán továbbá a lemniscus mediálisban és a fasciculus longitudinális mediálisban.

Túl azon, hogy e vizsgálatok elsőként igazolták a calpain-mediálta spectrin proteolízis jelenlétét (CMSP) DAI-ban, mind a fény-, mind pedig az elektronmikroszkópos megfigyeléseink újszerűek voltak a fent ismertetett klasszikus Ca²⁺-hypothesis tükrében. Szemben a korábbi elképzelésekkel azt találtuk, hogy a Ca2+-indukálta proteolízis 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 (p <0.05) (6. *ábra*).



6. ábra. CMSP-IR károsodott axonok átlagos denzitásának eloszlása (95% konfidencia intervallumok (CI) összehasonlítása). A 30 és 60 perc túlélési időnél számolt denzitás-érték már egyértelműen szignifikáns növekedést mutat.

Míg a traumát követő korai időpontokban az IR axonok morfológiailag kevéssé változtak, minimális duzzadás, kezdődő vacuolizáció jellemezte csupán őket (7.*A.ábra*), 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 (7.*B.ábra*).



7. ábra. A CMSP ICH markerével jelölt axonok 15 perccel és 2 órával a trauma után. A: a korai posttraumás időszakban megvastagodott, lineáris, vacuolizált axonszakaszok, a késői szakaszban (B) lefűződött, végbunkó képződést mutató profilok láthatók.

Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok további -a Ca²⁺-aktiválta proteolyticus folyamatokról vallott korábbi nézetek tükrében ugyancsak meglepő- adatokat eredményeztek; míg 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 (8.A.ábra), addig 30-60 perc után fokozatosan emelkedett az axoplazmában található csapadék mennyisége, s 120 perc után rendszerint a teljes axoplazmát kitöltötte, nem téve immár lehetővé a CMSP-IR kompartmentális elhatárolását (8.B.ábra).



Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelölési technikák (9-10.*ábra*) alkalmazásával a DAI jelenleg ismert legérzékenyebb IHC markerének, a NF oldalkar-módosulásán alapuló citoszkeletális 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 calpain-mediálta spectrin proteolysis kiemelkedő szerepet játszik a DAI patogenezisében.



9. ábra. Kettősen jelölt axonok a CSpT-ban 15 (A) illetve 120 perccel (B) trauma után. A.: CMSP (lila, VVIP) illetve a NFC (kék, BDHC), B: CMSP (barna, DAB) illetve NFC (kék, BDHC) IHC markerének kolokalizációja.



10. ábra. Elektronmikroszkópos felvétel a CMSP (DAB, nagyobb precipitátum) illetve a NFC (VVIP, kisebb, kerek precipitátum) ICH markerével kettősen jelölt axonszakaszról, 30 preccel trauma után. Jól látható, hogy a DAB-csapadék a subaxolemmális térben, illetve a kompaktálódott neurofilamentumokon jelenik meg (nyilak, ill. üres nyilak), míg a VVIP a kompaktálódott citoszkeletonon foglal helyet (nyílhegyek). A csillag a fellazult szerkezetű myelint jelzi.

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, neurofilament kompaktálódást, a mikrotubulusok számának csökkenését, a myelin hüvely fellazulását és periaxolemmális terek képződését találtuk. A kettősen jelölt axonszakaszokban a túlélési idő függvényében a CMSP-IR ugyanolyan kompartmentalizálódást mutatott, mint azt fentebb az egyes jelölés ultrastrukturális elemzése kapcsán már részleteztük.

Mind a fény-, mind az elektronmikroszkópos megfigyelések során találtunk azonban – elsősorban a medulláris pyramis területén- olyan vékonyabb axonszakaszokat, melyek már a sérülés utáni korai vizsgálatok esetén (15 perc) súlyos károsodást mutattak; bennük a finomszerkezetet teljesen elfedő IR-t jelző AB-csapadékot találtunk.

Következtetések

Megfigyeléseink értelmezéséhez és azok patofiziológiai jelentősége felismeréséhez a spectrin bevezetőben leírt, a subaxolemmális "membrán-szkeleton" kialakításában játszott szerepére kell emlékeztetni^{53,54,84}. Figyelembe véve a fent leírtakat illetve a Povlishock-munkacsoport

korábban említett, a sérült axon szakasz membrán permeabilitás-változására vonatkozó megfigyeléseit^{194,195,219}, továbbá azt a megfigyelésünket, hogy a DAI során a CMSP



11. ábra. A Ca²⁺⁻indukált spectrin proteolysis szerepe a DAI kóreredetében: a mechanoporáción alapuló calpain-kaszkád elmélete-I. A korai szakaszban a proteolízis kiterjedése korlátozott.

egyértelműen a traumától eltelt időtől függő kompartmentalizációt mutatott, az alábbi elmélet körvonalazható.

A trauma- kiváltotta axonális feszülés hatására Ca²⁺ áramlik a vongálódásnak - alaki adottsága és/vagy lefutása alapján - kitett axonszakaszba. A Ca²⁺ indukálta fehérjelebomlás a korai szakaszban limitált, kezdetben a subaxolemmális kompartmentre korlátozott (*11.ábra*). Mindez jól megfelel a calpain aktiválódásáról vallott jelenlegi biokémiai felfogásnak, mely szerint egy membrán-phospholipid-kapcsolt folyamatról van szó, melynek elengedhetetlen feltétele a calpain translocatiója a membránra.

Ezen Ca²⁺-indukálta subaxolemmális fehérjebontás az integráns membránfehérjékhez ankyrinen keresztül illetve közvetlenül is kapcsolódó spectrin-váz lebontása következtében destabilizálja az axolemmát, a Ca²⁺ beáramlása immár kiterjedt intraaxonális proteolízist indukál s így az axon károsodása visszafordíthatatlanná válhat (*12.ábra*) (ld. még az egyidejű caspase-aktiválódásra vonatkozó megjegyzéseket).

A Ca²⁺ hatására aktiválódó calcineurin-okozta neurofilament oldalkar-defoszforilálódás^{186, 195} és a calpain okozta proteolytikus oldalkar-módosulás együttesen a neurofilamentumok közti távolságot fenntartó ionkölcsönhatások ("repelling forces") megváltozásához és ezen keresztül a neurofilamentek közti távolság csökkenéséhez, az axonális citoszkeleton kompaktálódásához vezetnek. Mindez jelentősen felgyorsíthatja az intraaxonális fehérjelebomlás folyamatát, hiszen a

neurofilamentumok defoszforilált formában jóval érzékenyebbek fehérjebontó enzimekre^{77,90,188,227,234}.

A beáramló Ca²⁺ ugyanakkor a mikrotubulusok ion-erősség függő disszociációját előidézve közvetlenül felelős azok számának csökkenéséért.

A fokozott Ca²⁺-beáramlás hatására kialakuló mitochondriális károsodás patobiológiai jelentőségével lentebb foglalkozunk, itt megjegyezzük, hogy a mitochondriális laesio az ionpumpa-működés hátráltatása, az axonális energia-homeosztázis zavara következtében tovább gerjeszti a divalens kation-beáramlás indukálta patológiás fokú fehérjeemésztést. Mindezen, viszonylag kismértékű citoszkeletális változások mellé a túlélési időtől függően egyre nagyobb fokú, az axoplazma egészére kiterjedő CMSP kialakulása társul, amely a citoszkeleton destruálódásához, a mitochondriális permeabilitási pórus direkt, 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

elektronmikroszkópos vizsgálatokra történő konvertálására szolgáló *módszertani* újítás kidolgozása és tesztelése volt, mindazonáltal a vizsgálatok eredményei egyértelműen megerősítették a calpain-mediált fehérjebontó folyamatoknak a diffúz axonkárosodás kóreredetében játszott szerepével kapcsolatos korábbi megfigyeléseinket.

Fénymikroszkópos vizsgálataink során döntően a CSpT és az MLF területén találtunk a neurofilamentumok kompaktálódását (RMO-14) és a calpain-mediált spectrin lebontást (CMSP/Ab38) jelző IR-t (*13.ábra*). Míg fél órával a trauma után lineáris, alig vastagodott axon szegmentumok jelölődtek a fenti markerekkel, addig három óra elteltével az immunreaktív axonok nagy része duzzadt, vacuolizált, némelyikük teljességgel kettészakadt volt. Az axonok többsége coumarin és rhodamine fluorescenciát egyaránt mutatott, jelezve a vizsgált elsődleges antitestek colokalizációját. Ez a kolokalizációs módszer jóval inkább felhasználó-barát volt, mint a korábbi vizsgálatainkban használt peroxidáz alapú technikák.



13. ábra. Fluorescens kettős jelölt axon 30 perccel trauma után: a jel EM konverzióia. A: Kék coumarin jelöli az RMO-14 (NFC) antitestet, ugyanezen axonban piros rhodamine-tyramide jelzi az Ab-38-at (CMSP) (B). C: A és B digitális egybevetése (a püsöklila, kettősen jelölt axon alatt egyes jelölt kék, azaz NFC-t mutató axonszakasz látható.) D: a TSA→DAB konverzió. E és F az EM konverzió eredményét jelzi, ahol a nyilak a CMSP subaxolemmális illetve a kettős nyíl a mitochondrium-felszíni megjelenését mutatja. A konverzió után ultrastrukturálisan elemezhető axonszerkezet egyértelműen mutatja az NFC jelenségét. Láthatóan fellazult a periaxolemmális tér és a myelin (M). *E*-n jól látható a csillaggal jelölt ép axonok kiválóan megőrzött ultrastruktúrája, az egészséges myelin hüvely.

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 spektrumba 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-immunpozitivitást.

Az egyes mezők digitális egymásra vetítése megerősítette a reakció-termékek következetes és precíz megjelenését illetve igazolta a konverziós technika pontosságát, amennyiben a DAB csapadék pontosan a rhodamine jelölt axon szegmens felett alakult ki, illetve egyetlen izoláltan RMO-14 jelölt axon területén sem alakult ki DAB csapadék, mely ismét csak a módszer precizitása mellett szól (*13.ábra*).

Következtetések

Ultrastrukturális vizsgálataink során az egyik legfontosabb megállapítás annak felismerése volt, hogy –dacára a bonyolult inkubációs folyamatnak és a felhúzás- lefedés-leáztatás eseménysorának- a szövet finomszerkezeti részletei kiválóan megőrződtek, ismét feltárva az axon károsodásra jellemző ultrastrukturális részleteket, azaz a neurofilamentumok kompaktálódását, a mitochondriális duzzadást, a myelin hüvely fellazulását, periaxolemmális űr képződését. A CMSP-IR elektrondenz DAB csapadék azokban a károsodott axonokban jelent meg, melyek egyértelműen mutatták a neurofilamentumok kompaktálódását. A koponyasérülést követő 30 perc után a DAB elsősorban a subaxolemmális kompartmentben helyezkedett el, majd 3 óra után a kóros szerkezetű citoszkeletont az axon teljes átmetszetében befedte a DAB-csapadék.

A TSA kiváló specificitásról és szenzitivitásról tett tanúbizonyságot, hiszen csak károsodott axonszakaszokat jelölt, a csapadék nem diffundált az axonok közé vagy ép axonok területére. A DAB csapadék megjelenése legalább olyan intenzív, sőt, talán még markánsabb volt, mint kutatócsoportunk korábbi, más típusú peroxidáz reakción alapuló vizsgálatainál megszokhattuk, igazolva, hogy sem a jelfelerősítés, sem a tyramide saját, minimálisan elektrondenz volta nem befolyásolta hátrányosan az elektronmikroszkópos vizsgálatot.

65

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

A CMSP-vel kapcsolatos korábbi vizsgálataink eredményei^{29,33} valamint munkacsoportunknak a DAI során jelentkező mitochondriális károsodás kivédésére illetve a CsA axonoprotektív szerepére vonatkozó megfigyelései^{31,184,185,187} felvetették, hogy a "Pandora szelencéjeként" is emlegetett mitochondriumok^{267,298} "kinyílása", azaz az MPT jelenségének a membrán-permeabilitás zavara és/vagy közvetlen calpain emésztés hatására történő aktiválódása cyto-c kiáramláshoz és következményes apoptotikus enzim (caspase-3)aktiválódáshoz s így a citoszkeleton irreverzibilis hasításához vezethet. Kísérleteink célja annak FM és EM IHC-val illetve fluoreszcens kettősjelölési technikával való igazolása volt, hogy a Ca²⁺-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, 5 állat, mint nem sérült kontroll szolgált. Az állatoknak egyenlő csoportokban, 1-1 kontrollal kiegészítve 15, 30, 60 percig illetve 3 és 6 óráig engedtük túlélni a koponyasérülést. A szövettani feldolgozásra kerülő "semi-serial" módon gyűjtött metszetek első két csoportja kvalitatív és kvantitatív fény-mikroszkópos illetve kvalitatív EM IHC feldolgozásra került a mitochondriumokból kiszabaduló cyto-c kimutatására szolgáló antitesttel; a harmadik és negyedik csoport hasonló elemzését végeztük el a 120-kD SBDP-t kimutató antitesttel. Végül, az ötödik csoportba sorolt metszeteket fluorescens ICH technikával végrehajtott kettősjelölési vizsgálatokban használtuk fel, az alábbi antitest kombinációk kolokalizálására: Ab38 + cytoc, cyto-c + SBDP-120, SBDP-120+Ab38 és SBDP-120+p20 (további részleteket ld. a metodikai fejezetben).

i. Fénymikroszkópos, kvalitatív immunhisztokémiai megfigyelések

A kísérletes koponyasérülés kiváltását követően már 15 perc elteltével az agytörzs pontomedulláris 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 (*14.A,C.ábra*).



14. ábra. Cyto-c-IR (*A*, *B*) és SBDP-120-IR (*C*, *D*) axonok 15 (*A*, *C*)és 360 perccel (*B*, *D*) impakt akcelerációs koponyasérülés után. Jól látható, hogy a korai post-traumás szakban mindkét antitestet jelölő DAB csapadék lineáris, duzzadt axonszakaszokat fest, míg a késői szakban duzzadt, lefűződő, megszakadt folytonosságú axonszegmenseket jelöl az immunfestés.

A túlélési idő növekedésével (30-360 perc) ugyanakkor már a kvalitatív vizsgálat során is észlelhető volt az immunreaktív axonszakaszok számának jelentős növekedése. Az összes vizsgált időpontban és agytörzsi régióban a cyto-c-IR és SBDP-120-IR axonszakaszok morfológiai megjelenése rendkívül hasonlónak bizonyult: kezdetben fokális axon duzzanat, majd a túlélési idő növekedésével inkább vacuolizáltság, fragmentálódás, felszakadozás jellemezte őket (*14.B,D.ábra*).

Bár a vizsgálatoknak nem volt célja a neuronok perikaryonjának elemzése, megállapítható, hogy az agytörzsi magvakban érdemi IR-t a vizsgált markerekkel nem tapasztaltunk.

ii. 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).

iii. Ultrastrukturális vizsgálatok

Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal azonosított cyto-c-IR illetve SBDP-120-IR axonszakaszok mindazon morfológiai jeleket mutatták, melyeket az axonkárosodás finomszerkezeti elemzésekor jellemzően látunk: a fokális citoszkeletális károsodások közül mind a neurofilamentumok kompaktálódását, mind a mikrotubulusok számának csökkenését észleltük, akárcsak az axolemma redőzöttségét illetve a myelin hüvely fellazulását. 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 közvetlen közelében helyezkedett el, gyakran elfedve a mitochondrium finomszerkezetét (*15.A-C.ábra*).

Ahol a csapadék alatt a mitochondrium szerkezete kivehető volt, ott fellazult lamellákat, duzzadt mitochondriumot fényképezhettünk. Ezek a károsodott illetve csapadékkal fedett mitochondriumok kizárólag azon axon szegmensekben voltak láthatók, melyek a diffúz axonális laesio fent említett egyéb jeleit is mutatták. Ez a megfigyelés is kiemeli az alkalmazott anti-cyto-c elsődleges antitest azon tulajdonságát, hogy kizárólag a károsodott- mitochondriumokból kiszabaduló, tehát extra mitochondriális cyto-c-t jeleníti meg.

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 citoszkeleton elrendeződése is megváltozott: nemcsak kompaktáció, hanem fellazultság, feloldódás, szakadozottság volt látható, illetve organellum -így többek között duzzadt mitochondriumok-akkumulálódása is megfigyelhető volt (*15.D.ábra*).



15. ábra. Cyto-c-IR axon EM képe 30 perccel trauma után. B és C az A-n fehér illetve fekete nyíllal jelölt szakasz kinagyítása; B egészséges, C sérült axon, erre utal a myelin szerkezeti eltérése és a citoszkeletális károsodás. A nyilak B-n egészséges, C-n károsodot mitochondriumokat jelölnek, utóbbi felszínén a kiszabaduló cyto-c-t jelölő DAB csapadék figyelhető meg. D: Hat órával a sérülés után a károsodott mitochondriumok összegyűlése és körülöttük jelentős cyto-c-IR kialakulása látható (csillag).

Azok a metszetek, melyek a rendszerezett gyűjtésnek köszönhetően a cyto-c-IR axon szegmensekhez közeli területekről származtak, egyértelműen mutatták az SBDP-120-IR jeleit is, túl az axon-károsodás fent felsorolt jegyein.



A caspase aktiválódást, azaz az SBDP-120-IR –t jelző DAB csapadék a spectrin szerkezeti fehérje előfordulási helyein, azaz az axolemma alatt és a mitochondriumok felszíne körül fordult elő leginkább (*16.ábra*). 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.

iv. Kettős jelöléses immunfluorescens vizsgálatok

Az immunfluorescens vizsgálatok során mind az immunreaktív axonok lokalizációja, mind morfológiai megjelenése teljes mértékben megfelelt a korábbi közlésekben illetve saját munkánkban leírtaknak, továbbá visszatükrözte e kísérlet kvalitatív fénymikroszkópos IHC-megfigyeléseit (*17.ábra*).



17. ábra. Fluorescens kettős jelölés kombinációk a CMSP, mitochondrium-károsodás és a caspase-aktiválódás egyidejű kimutatására (MLF, 60 perccel trauma után). A: CMSP-IR, B: cyto-c-IR, C: digitális átfedés. D: Cyto-c_IR, E: SBDP-120-IR, F: digitális átfedés. G: p-20-IR (aktivált caspase-3-IR), *H*: SBDP-120-IR, I: digitális átfedés. J: CMSP-IR, K: SBDP-120-IR, L: digitális átfedés.

A kísérletes 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 (60–360 perc után) 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 legvégső végrehajtója, a caspase-3 enzim az alapvetően "nekrotikus" folyamatnak megismert diffúz axonkárosodás során aktiválódhat.

Következtetés

A calpain-mediált spectrin lebontás IHC markerének és a cyto-c felszabadulás immunfluorescens jelének egy adott axonban történő detektálása arra utal, hogy a spectrin

lebontást előidéző Ca²⁺ beáramlás (és vélhetően az ehhez járuló, calpain mediálta szerkezeti/membrán fehérje bontás következtében excessive bejutó Ca²⁺) 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 apoptoticus 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 "apoptoticus" 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^{287,289,290}.

Az irodalmi háttér felvázolásakor már részletesen ismertettük a nekrózis illetve apoptózis neurobiologiai folyamatokban játszott szerepével kapcsolatos ellentmondásokat. Vizsgálataink ismét aláhúzzák, 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, azt 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"^{287,288}.

III. A diffúz axonális károsodás kialakulásának vizsgálata – Diffúz agysérüléshez társuló gerincvelői axonkárosodás.

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

A diffúz axon károsodásra vonatkozó korábbi vizsgálatok, többek közt kutatócsoportunk eredményei is felvetették annak lehetőségét, hogy a klinikai tünetek (átmeneti légzésleállás, görcsroham, agytörzsi reflexek átmeneti kiesése) nélküli, enyhe koponyasérülés esetén is jöhetnek létre IHC vizsgálatokkal detektálható, károsodott axonok. Előzetes kísérletes vizsgálatainkban erre a kérdése kerestük a választ, amikor összesen 36 állatot tettünk ki IA koponyasérülésnek. Az állatok 1-1 harmadában a szokványos 2m helyett 50, 100, 150cm-ről alkalmaztuk a 450g tömegű súlyt a fentiekben leírt kísérleti beállításban. Az állatok arányos

csoportját 30, 60, 120 perc után dolgoztuk fel a már leírt módon, meghatározva az APP-IR axonok denzitását a CSpT-ban.

A fénymikroszkópos elemzés során már harminc perc elteltével a CSpT területén a nodális-paranodális szakaszon típusos APP-IR axon-szegmenseket 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: az APP-IR axonok száma 42.2 \pm 5.4 (átlag \pm sem, /mm²) 0.5m, 194 \pm 26.6 1m és 430.8 \pm 64.2 1.5m magasság esetén; hasonlóan, közel szignifikáns összefüggés mutatkozott az axonkárosodás mértéke és a kiváltó noxa közt eltelt idő vonatkozásában: az APP-IR axon-szegmensek átlagos denzitása 170.6 \pm 42.5 (átlag \pm sem, /mm²) 30-, 210 \pm 57.6 60-, és 280.7 \pm 79 120 perccel a trauma után.

Az összefüggést a regressziós analízis még inkább alátámasztotta: az APP-IR axonok átlagos denzitása és a túlélési idő közti összefüggés esetében a p érték 0.017-nek adódott, míg a sérülést kiváltó súlynál p 0.001 volt, miközben az r értéke 0.52.

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 gyorsulásos-lassulásos koponyasérülés kiváltotta gerincvelői DAI kvalitatív fénymikroszkópos elemzése során a DAI a már ismert agytörzsi pálya-szakaszokon (CSpT, MLF, ML) IR axon-szakaszok kialakulásában jelentkezett, az APP jelölés elsősorban duzzadt, a nodális-paranodális régióban immunjelölt-, időnként feltöredezett, elszakadt szegmenseken, az RMO-14 jel pedig lobulált, vacuolizált, és 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 (*18.ábra*).



18. ábra. RMO-14 (NFC) –IR axonszakaszok a nyaki illetve a háti gericvelőszakaszból 6 órával IAkoponya trauma után. A károsodott, IR axonszakaszok töredezettek, lobuláltak.

Az axonok e szakaszokon döntően a citoszkeletális károsodás markerével jelölődtek, mely morfológiailag az agytörzsben leírt RMO-14-IR-al teljesen megegyezően jelentkezett, ugyanakkor, a jóval kisebb számban detektált APP-IR axonszakaszok a gerincvelőben meglepő módon elsősorban az RMO-14-IR társaikra hasonlító lobulált, vacuolizált megjelenést mutatták (19.ábra).



19. ábra. A: APP- (axoplazmatikus transzport-zavar markere), B: RMO-14 (NFC) –IR axonszakaszok a cervico-thoracalis szakaszból két órával IA sérülés után. A nyíllal jelölt axon-ballon képződés egyértelműen látható, a két, különböző markerrel jelölt axonok jelentős morfológiai hasonlóságot mutatnak.

A kétoldalas ANOVA elemzés (Scheffe-féle post-hoc elemzéssel kiegészítve) azt mutatta, hogy a károsodott –IR- axonok denzitása mind a sérüléstől eltelt idővel, mind pedig a kiváltó noxával (súly/ejtési magasság) arányosan nőtt. Egy-, illetve két méterről ejtve a 450g súlyt, illetve 2-, 6-, 24 óra túléléssel a CSpT-ben és az MLF-ben a p értékek az alábbiak szerint alakultak: a CSpT: 2,2x10⁻¹⁷ APP-vel és 7,1x10⁻¹² RMO-14-el, az MLF: 1,4x10⁻⁶ APP-vel és 2,7x10⁻¹⁷ RMO-14-el. Kettő- és hat órás túlélés közt ismét szignifikáns változás állt be: $p=1,5x10^{-4}$ a CSpT-ben APP-IR-al, ugyanakkor nem volt szignifikáns változás a 6 és 24 órás túlélési idő közt.

A közepesen súlyos/súlyos traumát elszenvedett (2m ejtési magasság) csoportban az RMO-14-IR sérült axonok denzitása minden esetben szignifikánsan nagyobb volt, mint az APP-IR axonoké, különösen az MLF-ben (p=1,08x10⁻⁹).

Az alacsonyabbnak adódó denzitási értékektől eltekintve hasonló megfigyeléseket tettünk a cervico-thoracális régióra vonatkozóan is. E területen a károsodott, IR axonok denzitása maximumát hat órával a trauma után érte el, (p=0,006 2 és 6 óra közt APP esetében), ráadásul itt az axon-károsodás mértéke és a kiváltó noxa közti kapcsolat még nyilvánvalóbb volt: p=7,1x10⁻¹⁰ 1m és 2m ejtési magasság közt APP-; és p=3,15x10⁻¹⁰ RMO-14 esetében. Az RMO-14-IR axonok denzitása e vizsgált szakaszon is szignifikánsan magasabb volt, mint az APP-IR axonoké (p=7,5x10⁻⁶) (4.táblázat).

		Túlélés (óra)	APP, mean ± SD		RMO-14, mean ± SD	
Szövetblokk	Terület		Im	210	Im	2m
100 100000	CSpT	2	188 ± 30.3	542 ± 48.2	104 = 51.2	984 ± 68.9
1., CCJ		6	260 ± 36.7	862 ± 37.7	118 ± 19.4	1114 ± 255.2
		24	306 ± 91.3	338 ± 101.3	116 ± 48.4	1100 ± 374.2
	FLM	2	104 ± 20.7	228 ± 40.9	54 ± 28.7	436 ± 40.3
		6	154 ± 32.1	256 ± 67.3	66 ± 33.8	494 ± 60.2
		24	124 ± 57.7	254 ± 68.0	46 = 27.3	466 ± 69.7
2., C-Th		2	22 ± 14.8	96 ± 20.7	44 = 27.3	204 = 37.2
		6	54 ± 11.4	154 ± 45.1	46 ± 28.7	256 ± 84.5
		24	26 ± 24.1	116 ± 15.2	30 ± 16.7	222 ± 41.2
3., Th-L		2	Neg	7.6 ± 3.8	Neg	17.6 ± 5.1
		6	Neg	7.6 ± 4.1	Neg	20.8 ± 5.3
		24	Neg	5.6 = 2.4	Neg	14.8 ± 3.4

4. táblázat. APP-, és RMO-14-IR axonszakaszok denzitása illetve száma, átlaga és standard deviáció a gerincvelő különböző szakaszaiban, 2-, 6-, 24 órával 1-, illetve 2m magasságból kiváltott IA-koponyatraumát követően. *Neg*: elhanyagolható.

A Th-L átmenetben enyhe sérülés (1m) esetén gyakorlatilag nem találtunk immunreaktív axon szakaszt, ugyanakkor súlyosabb sérülés (2m) esetén az RMO-14 IR axon-szegmensek abszolút száma szignifikánsan magasabbnak bizonyult az APP-IR-nál (p=1,32x10⁻⁶), s mindkét immunfestés esetében a legtöbb károsodott axont 6 órával a sérülés után tudtuk megszámolni.

Következtetések

Az enyhe koponyasérüléssel kapcsolatos legfrissebb klinikai vizsgálatok modern képalkotó eljárások alkalmazásával mind több példát hoznak fel 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 imaging során frakcionált anizotrópia vizsgálattal illetve SWI-vel DAI közvetett illetve közvetlen jelei fedezhetők fel az agyállományban^{46,179,180}.

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 előidéztünk –méghozzá az alkalmazott sérülés intenzitásával és az attól eltelt idővel arányos- diffúz axonális károsodást.

E megfigyelés különösen felértékeli a diffúz axonkárosodást izoláltan előidéző IAkoponyasérülési modellben tett kísérletes terápiás észleléseinket: nem zárható ki, hogy az enyhe koponyasérültek MRI-vel és esetleg biomarker-vizsgálatokkal azonosított rizikócsoportjaiban az általunk állatkísérletekben pozitív eredménnyel kipróbált terápiás modalitások a későbbiekben klinikai kipróbálásra is kerülhetnek.

Külön jelentőséggel bír a gerincvelőben a koponyasérülés kísérőjelenségeként észlelt DAI. Miközben az IA modellben a sérülést előidéző, agytörzsi vongálódásra vezető gyors cranio-cervicális flexió következtében logikusan feltételezhető, hogy a gerincvelő felső szakaszán károsodott axonszakaszokat találunk, hasonló jelenség a cervico-thoracális átmenetben meglepő, a thoraco-lumbális területen pedig teljességgel váratlan (utóbbi területet eredetileg csupán "szövettani autokontrollként" elemeztük volna).

Az észlelt axonkárosodás magyarázata részben abban rejlik, hogy a gerincvelő a ligamentum denticulatumoknál illetve a kilépő gyökök területén rögzített helyzetben van, tehát a craniocervicális átmenetben bekövetkező extrém flexió hatására teljes hossza –a kiváltó noxától való távolsággal fordított arányban- vongálódik. Ugyancsak szerepet játszhatnak a gerincvelői DAI kiváltásában azok a "folyadék-lökéshullámok", melyek a fejtetőre eső tárgy illetve a fenti vongálódás következtében generálódnak^{163,165}.

Az igazságügyi orvos szakértői gyakorlatban a megrázott csecsemő szindróma ("shaken baby syndrome") esetében eddig érdemben nem vizsgálat spinális DAI elemzése szükségességének alátámasztásán túl vizsgálataink a centrális gerincvelő syndroma és a spondyloticus myelopathia kialakulásának keletkezésével kapcsolatban is figyelem felhívó adatokat szolgáltatnak.

Bár évek óta tudjuk, hogy a hosszú ideig vasculáris eredetűnek feltételezett, haemorrhagiás nekrózissal magyarázott, idős spondyloticus betegek arcra esésekor hyperextensios mechanizmussal létrejövő centrális gerincvelő laesio hátterében nem haematomyelia, hanem elsősorban axonális laesio áll^{150,166,220}, olyan modellt, mely a fenti jelenséget akár részben magyarázná, nem írtak le. Eredményeink ismeretében joggal vetődik fel, hogy az időskori, gerincvelőt komprimáló spondyloticus peremek olyan "fulcrum"-ként szolgálhatnak, amelyen a gerincvelő megtörhet és flexió-, főként pedig extenzió-disztrakció hatására vongálódhat. Ez a jelenség akutan is létrejöhet, nagy kiterjedésű, diffúz axonkárosodást eredményezve (centrális gerincvelő syndroma) de krónikusan fennállva is fokozatos, kiterjedt axonkárosodást eredményezhet (spondyloticus myelopathia).

75

IV. A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis feldolgozása.

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

A bevezetőben részletezett okok miatt rendkívül fontos a klinikai gyakorlat számára, hogy a koponyasérültek ellátásában használható biomarkert, azaz a sérülés által kiváltott biológiai folyamatokba is betekintést engedő jelölő anyagot sikerüljön azonosítani. Sajnálatos módon, az eddig alkalmazott "surrogate markerek" nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket; a hazánkban is több helyen alkalmazott, legígéretesebb S100ß megbízhatóságát sok kritikai észrevétel éri, polytraumatizáció esetében például az adipocyta eredetű fehérje felszabadulása miatt teljességgel megbízhatatlan¹⁹⁰⁻¹⁹².

Alapkutatási eredményeink alapján joggal reméltük, hogy a calpain és caspase-mediált fehérjebontó folyamatok aktiválódása során ilyen, a bevezetőben definiált klasszikus biomarker követelményeinek megfelelő termékek keletkeznek, melyek megjelenítésére kezdtünk szervezett liquorminta gyűjtést a PTE ÁOK Idegsebészeti Klinikán. Az adatgyűjtés a 2002-ben elindított Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbank része, mely a mai napig több mint 300 súlyos koponyasérült klinikai monitorozási adatait, képalkotó-, laboratóriumi- és neuropszichológiai vizsgálatainak és rendszerezett után követésének eredményeit tartalmazza. A fenti adatbank elemzését elővizsgálatokkal kezdtük, melyek során a metodikai bevezetőben részletezett három betegcsoport (súlyos koponya-agysérült, nem- traumás-eredetű intracraniális nyomásemelkedésben szenvedő betegek, illetve subarachnoideális vérzés, meningitisz vagy SM gyanúja miatt végül negatív eredménnyel lumbális punkción átesettek) liquormintáit Western blot ("dot-blot") módszerrel hasonlítottuk össze.

A Western blot vizsgálatok denzitometriás eredménye során azt találtuk, 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 betegek esetén (66% szemben 11% illetve 75% szemben 22% gyakorisággal). A diagnosztikus lumbál-punkción átesett betegek CSF-mintái nem tartalmaztak a vizsgálati módszereinkkel kimutatható mennyiségű SBDP-t.

Az intakt spectrin, valamint a 150kD és a 120kD nagyságú SBDP-k szintjét szignifikánsan magasabbnak találtuk koponyatrauma esetén, mint a vizsgált nem-traumás, ugyanakkor a koponyaűri nyomás fokozódásával járó agysérülésekben (20-21.ábra).



A vizsgált fehérjék liquor-szintjében megbízhatóan reprodukálható módon a trauma utáni 2-3. napon tetőzést találtunk, majd az ismét visszatért a kiindulási szintre, ezt követően néhány beteg esetében egy újabb emelkedés volt tapasztalható (22.ábra).





A spectrin-szintek és a klinikai paraméterek összehasonítása 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 közel szignifikáns (negatív) korrelációt mutatott; ez a trend a relatíve kis betegszám ellenére egyértelműen megfigyelhető volt (280 kDa: r^2 =0.318 P=0,07; 150 kDa: r^2 =0.245 P=0.121; 145 kDa: r^2 =0.209 P=0.156).

dc 14 10

Következtetések

A klinikai minták feldolgozása igazolta azt az elképzelésünket, hogy a súlyos koponyasérültekben ugyanazon fehérjebontó kórfolyamatok tetten érhetők, mint a koponyatrauma állatkísérletes modelljeiben. Eredményeinket egy potenciális biomarker kifejlesztésének 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, hanem a traumás agysérülés következménye.

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 vizsgálata a jövőben hasznos patomechanizmus-specifikus biomarker lehet a koponyatraumát szenvedett betegek állapotának nyomon követésében. E kijelentést időközben mind állatkísérletes, mind klinikai (elő-) vizsgálatok^{36,161,197,202,222} is alátámasztották.

Az eredmények további megerősítésének és klinikai relevanciája igazolásának alapfeltétele a liquor-, és szérum-adatbázis további feldolgozása, ugyanakkor a Western blot vizsgálatokban önmagában már az elsődleges antitest olyan költséget jelent, mely a hazai kutatástámogatási rendszerben nem finanszírozható. A cél olyan megfelelő érzékenységű ELISA kidolgozása, diagnosztikai értékkel bíró szérum-tesztek kifejlesztése, melyek a rutin diagnosztikában is alkalmazható, a sérülés súlyosságának illetve a várható kimenetelnek valamint a terápia hatékonyságának megítélésére alkalmas "point of care device" alapjául szolgálhatnak. E multicentrikus kutató-fejlesztő tevékenységben munkacsoportunk a University of Florida spin-off cégeként alakult BANYAN INC. vezetése alatt –az USA védelmi minisztériuma által támogatott- "BANDITS" kutatási program társintézményekénttevékenyen részt vesz. A vizsgálatokból eddig csak előzetes eredmények kerültek ismertetésre, az ezeket tartalmazó kongresszusi összefoglalók illetve bírálat alatt álló közlemények listája a közlemények sorában szintén megtalálható.

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

Mint a bevezetőben részletesen kifejtettük, a Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis létrehozásával a koponyasérültek ellátására vonatkozó klinikai epidemiológiai vizsgálatok alapját teremtettük meg. E vizsgálatok egyik fő célkitűzése annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy milyen prediktív modellt tudunk alkotni a sérült felvételekor rendelkezésünkre álló adatok alapján. Ahogy korábban ugyancsak részleteztük, az ilyen modellek nemcsak a várható kimenetel becslése, hanem az ellátás auditálása szempontjából is kiemelkedő jelentőségűek.

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

5. táblázat. Különböző CT- illetve demográfiai paraméterek összefüggése a kimenetellel. A 0-3. nap közötti halálozást döntően az elsődleges agysérülés, a 0-10 közöttit emellett a másodlagos sérülése is befolyásolja, míg az összes halálozás esetében későbbi szövődmények is szerepet játszanak.

Teljes populáció	Vizsgált paraméter	OR	р
	Életkor (év)	1,118	0,000
	Subarachnoideális vérzés	3,619	0,031
Összes halálozás	Kamrába törő vérzés	3,952	0,049
033203 1141410243	Ciszterna eltűnt	47,056	0,001
	Ciszterna kompresszió	3,328	0,136
	Plexus/Corp. Pineale aszim.	0,184	0,014
	Nem (férfiak)	0,276	0,050
	Életkor (év)	1,074	0,000
	Oedema generalizált	5,827	0,205
Halálozás 0-10. napon	Oedema részleges	1,166	0,911
	Kamrába törő vérzés	5,263	0,010
	Ciszterna eltűnt	12,108	0,017
	Ciszterna kompresszió	2,26	0,346
	Kamrába törő vérzés	5,917	0,001
Halálozás 0-3. napon	Plexus/Corpus Pineale aszimmetria	0,202	0,003

Az elemzés során 99 súlyos koponyasérült (post-resuscitatiós GCS 8 vagy az alatti) CT vizsgálatait, meghatározott klinikai paramétereit és túlélési adatait vetettük egybe a Marshallféle beosztás valamint a Rotterdam score alapján számolt értékekkel (*5. és 6.táblázat*).

Képelemzéssel vizsgáltak	Vizsgált paraméter	OR	р	
	Életkor (év)	1,07	0,012	
Összes halálozás	Subarachnoideális vérzés	4,102	0,055	
055205 1141410245	Ciszterna kompresszió	0,139	0,048	
	Ciszterna eltűnt	0,055	0,013	
	Életkor (év)	1,062	0,046	
	Kamrába törő vérzés	44,562	0,004	
	Ciszterna kompresszió	0,055	0,011	
Halálozás 0-10. napon	Ciszterna eltűnt	0,02	0,019	
	Plexus/Corpus Pineale	0.134	0.055	
	aszimmetria	.,		
	Subdurális vérzés (cm3)	1,024	0,031	
	Kamrába törő vérzés	68,102	0,002	
Halálozás 0-3. nanon	Subdurális vérzés	9,216	0,047	
	Plexus/Corpus Pineale	0.033	0.006	
	aszimmetria	0,000	0,000	
Képelemzés nélküliek	Vizsgált paraméter	OR	р	
Összes halálozás	Életkor (év)	1,177	0,002	
	Subarachnoideális vérzés	16,157	0,031	
	Életkor (év)	1,075	0,003	
Halálozás 0-10. napon	Ciszterna kompresszió	2,907	0,352	
	Ciszterna eltűnt	15,921	0,033	

6. táblázat. Különböző CT- illetve demográfiai paraméterek összefüggése a kimenetellel számítógépes képelemzés esetén illetve annak hiányában

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-vel). 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 r² elemzés azt is igazolta, hogy a számítógépes képelemzéssel nyerhető további információkkal valamint az életkorral kiegészített Rotterdam score adja a leggpontosabb prognosztikai eredményt (*23.ábra*).

Következtetések

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy mind a Rotterdam score, mind a Marshall-féle beosztás kellően nagy prediktív erővel rendelkezik súlyos koponyasérülések esetén, ezért ezirányú 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.

Ilyenek lehetnek: generalizált oedema, impressiós törés, plexus choroideus/corpus pineale aszimmetria (fontos a Gentry standard beállítása!).



23. ábra. A Marshall-féle beosztás, a Rotterdam score, a Rotterdam score elemei illetve a vizsgálatok során alkalmazott prediktív modell (CT paraméterek és demográfiai adatok) összfüggése a korai halálozással súlyos koponya-agysérültek esetén.

Elsősorban többváltozós elemzéseink alapján válik egyértelművé, hogy a CT felvételek számítógépes szoftverrel végzett egzakt analízisével (esetünkben Dicom) gyűjtött adatok

alapján képzett prognosztikai csoportosítások prediktív értéke messze meghaladja a hagyományos CT képek elemzésének értékét, (ez különösen annak az ellenállásnak az ismeretében érdekes adat, amelyet a felhasználói oldalon a klinikusok a kizárólag digitális képrögzítési-leletezési technika bevezetése ellen tanúsítottak.)

Megállapítható, hogy noha a Marshall-féle beosztás és a Rotterdam score prediktív értéke önmagában is magas, ha igazán hatékony becslést akarunk adni az sérült klinikai kimenetelére vonatkozólag, akkor nem tekinthetünk el - az azt alapjaiban meghatározó - individuális tényezőktől, mint pl. az életkor. Felmerül az igény, hogy ahol nem áll rendelkezésre digitálisan feldolgozható formátumú CT eredmény, ott szükséges a felvételek digitalizálása és volumetriás elemzése.

A fenti eredmények alapján a Koponyasérült Adatbázis további feldolgozása zajlik, immár összesen több mint 350 sérült adatai alapján nemcsak a fenti képelemzés prediktív értékét vizsgáljuk és készítjük elő "peer reviewed" publikációra, hanem azt is elemezzük, hogy az interneten elérhető IMPACT predikciós rendszer alkalmazható-e a magyarországi ellátási viszonyokra is.

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 elemzése nemcsak az ellátást finanszírozó biztosító, hanem az ellátó alapvető érdeke és feladata is kell, hogy legyen. Az ilyen adatbázis elemzések nemzetközi szinten tudományos értékkel csak rendkívül nagyszámú beteg esetében bírnak, illetve, ha az elemzés olyan alapkutatási vizsgálatokon nyugszik, mint esetünkben a spektrin és lebomlási termékeinek elemzése. Fentiek alapján az adatbázisunkból származó közlések túlnyomó többségét a disszertációból kihagytuk, a teljesség kedvéért azonban a hivatkozásokhoz csatoljuk.

82

V. 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 kóreredetében 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. A Marmarou-féle impakt-akcelerációs koponyatrauma (DAI-) modellben a sérülés előtt 30 perccel MDL-28170-t, vagy vivőanyagot (kontroll) farok vénán keresztül bolus-adagolásban kapott, trauma után két órával leölt patkányok agytörzsi metszeteit feldolgozva az axonkárosodás klasszikus markerével (anti-APP), illetve az NFC markerével (RMO-14) immunhisztokémiát végeztünk. A károsodott axonok denzitását a CSpT-ben és az MLF-ben összehasonlítottuk a kezelt és a kontroll patkányok között.

Az anti-APP-pozitív és az RMO-14-pozitív axon-profilok morfológiai jellemzőiben nem volt megfigyelhető különbség a kezelt illetve a kontroll patkányokban (24. és 25.ábra). A kvantitatív analízis szerint a trauma előtt végzett MDL-28170 kezelés ugyanakkor szignifikánsan csökkentette az RMO-14-pozitív axonok számát mind a CSpT, mind pedig az MLF területén (1864.2 \pm 200.7_{RMO-IR} (átlag \pm sem, /mm²)-ról 1155.0 \pm 54.7_{RMO-IR} –ra (t=3.05, df=7, p<0.02), illetve 109.7 \pm 16.8_{RMO-IR} -ról 52.5 \pm 9.7_{RMO-IR} –ra (t=2.74, df=7, p<0.03)). Az anti-APP-pozitív axonok száma is statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott az MDL-28170-nel való kezelést követően mindkét vizsgált agytörzsi területen 1771.6 \pm 278.5_{APP-IR} -ról 757.5 \pm 194.3_{APP-IR} –ra (t=2.82, df=7, p<0.03) illetve 85.7 \pm 7.1_{APP-IR} -ról 50.8 \pm 1.6_{APP-IR} –ra (t=4.25, df=7, p<0.01).



24. ábra. APP-IR (axoplazmatikus transzport zavarát mutató) axonok a CSpT-ből (*A*, *B*) és MLF-ből (*C*, *D*) 2 órával IA-koponyatrauma után. A vivőanyag kezelt állatban (*A*,*C*) a károsodott axonok denzitása szemmel láthatóan nagyobb, mint a calpain inhibitor MDL-28170 kezelésben részesült patkányban (*B*, *D*)



Következtetések

A calpain- gátlásnak az NFC kialakulására kifejtett jótékony hatása magyarázható a calpainmediált spectrin-bontás és az NFC ismert kapcsolatával. Bár a legújabb kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az NFC és az axonális transzport-zavar (impaired axonal transport, /IAT/) különböző axon-populációkat érint^{148,259}, a calpain-gátlásnak az IAT-ra kifejtett pozitív hatása azt bizonyítja, hogy – ha a kompakció nem is társul feltétlenül minden esetben transzport-zavarral – a calpain aktiválódása mindkét folyamatban jelentős szerepet játszik.

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

A fenti eredmények megerősítették a korábbi vizsgálatok során felvetett, a calpain aktiválódásnak a DAI kóreredetében játszott szerepére vonatkozó elméleteket, ugyanakkor kevés új és közvetlen információt szolgáltattak a calpain intraaxonális szerepére.

Mivel a Robert Simon által termeltetett nyúl polyclonális antiszérum nem állt már rendelkezésünkre, a Floridából (Kevin K. W. Wang) származó calpain specifikus lebontási terméket Western blot vizsgálatokban kimutató SBDP-150 pedig nem adott meggyőző és reprodukálható IHC reakciót, a calpain hatását és gátlásának következményeit a membránpermeabilitási zavar kimutatásán keresztül próbáltuk megközelíteni.

Az 1ml vivőanyagban feloldott 30 mg/kg MDL-28170-el illetve vivőanyagával 30 perccel a diffúz koponyasérülés kiváltását megelőzően farok vénán át bolus injekcióban kezelt patkányok (4-4 állat) agytörzsi metszeteinek hisztokémiai feldolgozása után végeztünk fénymikroszkópos megfigyeléseket.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy fiziológiás körülmények között az axon ép membrán-rendszerén át nem jutó tormagyökér-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 terültén, mint a vivőanyaggal kezeltek esetében (26.ábra). Bár a jelölt axonok alaki megjelenésében számottevő egyéb különbség nem volt, a vivőanyaggal kezeltek gyakrabban tűntek hólyagosnak, "vacuolizáltnak", ami a CMSP-IR axonok esetében 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 tormagyökérperoxidázt halmozó jelölt axonszakaszok hossza szignifikánsan rövidebb a gyógyszeresen kezelt állatokban a CSpT-ban (48.1±3.4 µm illetve 84.2±5.2 µm [t=2.57, df=6, p<0.04)], ugyanakkor érdemi változást az MLF területén nem mutat (120,1±10,1 µm illetve 120,4±6,2 µm). Bár a vivőanyaggal kezelt állatokban mind a CSpT-ben, mind pedig a MLF-ben vastagabbnak adódott a tormagyökér-peroxidáz jelölt rostok átmérője, mint a gyógyszert is kapott patkányok esetében, e különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (2,5±0,1 µm a CSpT és 4,9±0,3 µm az MLF területén MDL-28170 kezelés esetén, illetve 2,9±0,2 µm a CSpT és 5,8±0,3 µm az MLF területén vivőanyag kezeltekben).



26. ábra. Tormagyökér peroxidázt akkumuláló károsodott membrán-permeabilitású axonok patkány CSpTben, két órával IA-koponyasérülést követően. A vivőanyag kezelt állat (*B*) axonjai hosszabb szakaszokon jelölődtek, varicosusabb, vacuolizáltabbak, mint az MDL-28170 kezelt állatból származók (*A*).

Következtetések

E vizsgálat eredménye arra utal, hogy a sérülés során a DAI-t kiváltó gyorsulás-lassulás hatására vongálódást és nyírást elszenvedő axonok membránjának sérülése (ún. "mechanoporáció") következtében a tormagyökér peroxidáz beáramlott az axonokba, jól jelezve azokat a területeket, ahol a permeabilitási zavar következtében calpain aktiválódás feltételei fennállhattak. A trauma előtt adott calpain inhibitor az axolemmális permeabilitási zavar másodlagos (elgondolásunk szerint döntően calpain-mediált spectrin proteolysissel 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 érdemi változás detektálását illetve az sem zárható ki, hogy a vastagabb tengelyfonatokban az MLF területén lassabban generalizálódott a permeabilitási zavart is fokozó calpain mediált fehérjebontás.

Összegezve, a vizsgálatok újabb bizonyítékkal támasztották alá a clacium-indukált, calpain-mediált strukturális fehérjebontó folyamatoknak a DAI kóreredetében feltételezett szerepét és megfelelő alapot szolgáltattak ahhoz, hogy a calpain-mediált fehérjebontás "nyomait" súlyos koponyasérültek agyvizében megpróbáljuk kimutatni, illetve, hogy a nekrotikus folyamatokat befolyásoló további, kísérletes terápiás vizsgálatokat indítsunk el.

VI. 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 patkányokat 2 illetve 6 órával a koponyatrauma után perfúziósan fixálva, szövettanilag az agytörzset feldolgozva sikerül-e a károsodott, immunjelölt axonok denzitásában csökkenést látni.

A szagittális agytörzsi metszeteket anti-APP immunhisztokémiával vizsgáltuk, a károsodott axonok számát a kezelt illetve a kontroll patkányokban a CSpT és az MLF területén hasonlítottuk össze. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy intravénás adagolás esetén – más KIR betegségekben hatásosnak bizonyult dózisban – a PACAP nem bizonyult neuroprotektívnek (sem a CSpT sem pedig az MLF területén nem csökkentette szignifikánsan az APP immunpozitív axonok számát) (27.C.ábra).

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

A PACAP intracerebroventrikuláris adagolásban 1 μg-os és 10 μg-os dózis esetén szintén nem bizonyult hatásosnak, 100 μg-os dózis azonban szignifikánsan csökkentette a CSpT területén talált anti-APP immunpozitív axonszakaszok előfordulását (p<0.05) (27. és 28.ábra).



27. ábra. APP-IR axonszakaszok a CSpT-ben két órával IA koponyasérülést követően. A: ál-operált ("sham injured") kontroll; B: vivőanyag-kezelt állat; C: a trauma előtt iv. PACAPkezelt patkány; D: 1μg-, E: 10μg-, F: 100μg PACAP icv. alkalmazásával kezelt patkány. A nyilak száma a statisztikailag megállapított axon-denzitással arányos.



28. ábra. APP-IR axonszakaszok denzitása (IR-axon/mm²) a CSpT-ben (A) és az MLF-ben (B) két órával IA koponyasérülést követően: dosis-hatás görbe megállapítása. A csillag a CSpT-ben 100µg PACAP icv. alkalmazása során megfigyelt szignifikáns axonoprotektív hatást jelzi.

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

Miután előző kísérletünkben a PACAP axonkárosodást gátló hatására vonatkozó dózis-hatás görbét felállítottuk, a trauma kiváltását követően késleltetve, icv-adott PACAP hatékonyságának tesztelésével a PACAP axonoprotektív hatására vonatkozó terápiás ablakot kívántuk meghatározni. A Marmarou-féle készülékkel kiváltott koponyatrauma után 30 perccel illetve 1 órával 100 µg icv-beadott PACAP- vagy vivőanyag-kezelésben részesült patkányokat a traumát követően 2 órával perfundáltuk. A szagittális agytörzsi metszetek egy részén az axoplazmatikus transzport zavarának markerével (anti-APP), a szomszédos metszeteken pedig az NFC markerével (RMO-14) immunhisztokémiát végeztünk. A károsodott axonok számát a CSpT-ben és az MLF-ben összehasonlítottuk a kezelt illetve a kontroll patkányok között.

A PACAP 100 μg-os dózisban mind 30 perccel (p<0.01), mind pedig 1 órával a koponyatrauma kiváltása után icv.-beadva szignifikánsan (p<0.001) csökkentette a CSpT területén az anti-APP-pozitív axonok denzitását (29. és 30.ábra). Nem volt azonban hatással – a fenti időpontok egyikében sem – az anti-APP-pozitív axonok denzitására az MLF területén, illetve az RMO-14-pozitív axonok denzitására egyik vizsgált agytörzsi területen sem.







29. ábra. APP-IR axonszakaszok a CSpTben 2 órával IA- trauma után vivőanyag kezelt kontroll állatban (A) illetve a traumát követően 30 perccel (B) és egy órával (C) 100μg PACAP-ot icv. kapott patkányokban.



30. ábra. APP-IR axonszakaszok denzitása a CSpT-ben és az MLF-ben 2 órával IA- trauma után vivőanyag kezelt kontroll állatban illetve a traumát követően 30 perccel és egy órával 100µg PACAP-ot icv. kapott patkányokban.

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 intracerebroventriculáris alkalmazása jelentős mértékben csökkentette az IA koponyasérülés hatására kialakult axonális károsodást, szükségesnek láttuk, hogy az eredményeket a diffúz koponyasérülés más modelljében is megerősítsük; így esett a választás a döntően diffúz károsodás kialakulását eredményező centrális folyadék perkussziós modell alkalmazására. Az újabb modellen végzett vizsgálat esetleges pozitív eredménye feltétlenül lökést adhatna új, akár intravénásan is alkalmazható PACAP-analógok kifejlesztésének, ráadásul válasszal szolgálhatna arra a kérdésre is, hogyan viselkednek a szer hatására e modellben a különböző kórfolyamatok aktiválódása révén károsodásukkor eltérő immun-jelöléssel (APP-IR illetve RMO-14-IR) jellemezhető axonszakaszok.

Az agytörzsből rendszerezetten gyűjtött vibratom-metszetek kvalitatív vizsgálata során az APP és RMO-14 IR axon-szegmentumok megjelenésében a korábbi vizsgálatokhoz képest nem tapasztaltunk eltérést, az ép, IHC reakcióval nem jelölt axonok között elszórtan a CSpT és az MLF területén találtuk a fenti módon jelölt, a DAI morfológiai jegyeit mutató sérült axonszakaszokat (*31. és 32. ábra*). Az ál-operált állatokban ezúttal sem észleltünk immunreakciót mutató axonokat, ugyanakkor RMO-14 festéssel az elvárhatónak megfelelő perikaryon festődést találtunk az agytörzsi magvak területén. A PACAP-, illetve vivőanyag kezelt állatok esetében az IR axonszakaszok alaki megjelenésében különbséget ezúttal sem észleltünk.



31. ábra. APP-IR axonszakaszok CSpT-ben (A, B) és az MLF-ben (C, D) a trauma után 30 perccel vivőanyag kezelt kontroll állatokban (B, D), illetve 100µg PACAP-ot kapott patkányokban (A, C). IA koponyasérülés, 2 órás túlélési idő. Az APP-IR elsősorban nodális-paranodális területeken, rövidebb szakaszon jelöli a károsodott axonokat.

A 100 µg 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 APPés RMO-14-IR axonok denzitása szignifikánsan csökkent, míg az MLF területén a változás egyik marker esetében sem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (*33. ábra*).



32. ábra. RMO-14-(NFC-) IR axonszakaszok CSpT-ben (A, B) és az MLF-ben (C, D) a trauma után 30 perccel vivőanyag kezelt kontroll állatokban (B, D), illetve 100μg PACAP-ot kapott patkányokban (A, C). IA koponyasérülés, 2 órás túlélési idő. Az RMO-IR vastagabb, vacuolizáltabb axonszegmensekben tűnik fel.

Következtetések

A fenti vizsgálatokat összegezve, 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 koponyasérülés

kiváltotta agysérülés kórfolyamatában aktívan résztvevő kórfolyamatot, tehát a nekrotikus illetve apoptotikus jelenségeket is befolyásolhatja, s így a DAI kórfolyamatának gátlásában (axono-) protektív- szerepe lehet, sikerült -legalábbis részben- igazolnunk^{133, 284}.



33. ábra. APP-IR (A) és RMO-14-IR (B) axonszakaszok denzitásának (IRaxon/mm²) alakulása a vizsgált anatómiai régiókban. Az állatok a centrális folyadék perkussziós trauma modellben a trauma után 30 perccel icv. vivőanyagot vagy 100µg PACAP-ot kaptak, a túlélési idő 2 óra volt. A CSpT-ben mindkét markerrel jelölt károsodott axonok denzitása szignifikánsan csökkent (csillag).

Kezdeti vizsgálatainkban, az intravénás adagolás sikertelensége abban keresendő, hogy – bár a PACAP bizonyítottan átjut a vér-agy gáton – transzportjának mértéke az agytörzsben sokkal alacsonyabb, mint más agyterületeken¹⁸¹. Hasonlóan, az agytörzs területén a feltételezett alacsony mértékű liquor-agy transzport lehet a magyarázata a más kísérletekben tapasztaltabbaknál magasabb hatásos dózis igénynek icv. alkalmazás esetén.

További kísérleteinkben sikerült a PACAP axonális károsodást gátló adagolását meghatároznunk 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 azt a korábban már említett különbséget, mely a DAI kinetikájában egyes spécieszek között megfigyelhető^{240,242,292}, eredményeink klinikai relevanciája még szembetűnőbb.

A vizsgálatok egy részében a PACAP NFC-ra gyakorolt jótékony hatásának elmaradása megerősíti azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint az IAT és az NFC részben különböző axon-populációkat érint^{148,259}, és kialakulásukban részben különböző mechanizmusok játszanak szerepet. Az IAT-ra gyakorolt PACAP-hatás elmaradása 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. Természetesen az

sem zárható ki teljességgel, hogy az MLF területén elhelyezkedő, két órával a trauma után főként NFC-t mutató, döntően szenzoros információt közvetítő rostokban ébredő kórfolyamatokat a PACAP kevésbé befolyásolja.

VII. 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.

E tanulmányok és a bevezetőben részletezett, a PARP-gátlás neuroprotektív hatására vonatkozó megfigyelések alapján azt vizsgáltuk, hogy a Pécsi Egyetemen kifejlesztett és számos kísérleti modellben bizonyítottan hatékony PARP inhibitor, az L-2286 alkalmazása képes-e a DAI gátlására, és az esetlegesen megfigyelhető kvalitatív és kvantitatív axon-szerkezeti változásokkal egyidejűleg a lokomotoros-, illetve alapvető sztereotip magatartási teljesítmény 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 (7. *táblázat*). Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a 10 μg dózisban 30 perccel az impact akcelerációs koponyasérülés után intracerebroventriculárisan adott L-2286 a két órával a koponyasérülést követően elvégzett szövettani feldolgozás tanúsága szerint semmi nemű hatást nem fejtett ki a károsodott axonok denzitására, míg 50 μg dózis esetén, bár csökkent denzitásuk, de a hatás nem bizonyult szignifikánsnak; végül a szignifikáns axon-protektív hatást 100 μg L-2286 alkalmazásával sikerült elérni.

	vivőanyag	10 □g	50 □g	100 □g
denzitás	345.61±41.56	348.09±13.08	255.58±10.72	87.61±8.86
p érték		ns	ns	<0.01 (**)

7. táblázat. Az L-2286 axon-védelemre vonatkozó dózis-hatásgörbéjének felállítása.

A fenti kísérletben kiválasztott adagolással (100 µg bolus, sztereotaxiás alkalmazással, icv adva) az L-2286 szignifikánsan csökkentette a CSpT területén mind az RMO-14, mind pedig az APP-IR axonszakaszok denzitását (*34. ábra*). 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 (*8. táblázat*).

APP-IR axonok	vivőanyag	L-2286 közvetlenül trauma után	p értéke vivőanyaghoz képest	L-2286 30min trauma után	p értéke vivőanyaghoz képest
CSpT	345.61±41.56	72.50±8.54	p<0.01	87.61±8.86	p<0.01
MLF	285.33±48.90	45.59±4.09	p<0.01	71.17±7.23	p<0.01
RMO-14-IR axonok	vivőanyag	L-2286 közvetlenül trauma után	p értéke vivőanyaghoz képest	L-2286 30min trauma után	p értéke vivőanyaghoz képest
CSpT	88.29±6.55	5.56±2.98	p<0.01	45.81±5.04	p<0.01
MLF	131.66±21.39	16.01±3.04	p<0.01	42.92±2.3	p<0.01

8. táblázat. Az L-2286 hatása az axonkárosodás markereivel jelölt, sérült axonok denzitás-értékére ((IR-axon/mm²)

A magatartás vizsgálatok során az egyensúlyozás (beam balance) teszt eredményeinek értékelésekor az ál-operált állatok esetében motoros/magatartási változást nem tapasztaltunk; a teszt során a vivőanyaggal kezelt állatok nyújtották a legrosszabb motoros teljesítményt. Az L-2286 mindkét (azonnali posttraumás-, illetve 30 perccel a sérülés után adott) alkalmazása esetén javította a rúdon való egyensúlyozás képességét; közvetlenül trauma után adva ez az első órában szignifikánsnak adódott, későbbi ellenőrzés során a szignifikancia azonban nem volt észlelhető, s az állatok nem érték el a maximális adható pontértéket a vizsgált hét napos periódusban. A 30 perccel trauma után alkalmazott szer hatására a vivőanyag kezelt állatokhoz képest minden vizsgált időpontban szignifikánsan jobb teljesítményt észleltünk (9. táblázat).

	(a		p érték ál-	L-2286 közvetlen	p érték	L-2286 30	p érték
Beam-balance	Al-operalt	vivõanyag	operálthoz	trauma után	vivô-	perccel	vivö-
			-		anyaghoz	trauma után	anyaghoz
1ó	1	6	p<0.001	3.8±0.58	p<0.05	4.8±0.2	ns
1 nap	1	5.6±0.24	p<0.001	3.4±0.4	ns	2.6±0.24	p<0.01
2 nap	1	4.8±0.2	p<0.001	3±0.55	ns	2.4±0.24	p<0.05
3 nap	1	5.2±0.2	p<0.001	2.6±0.6	ns	1.4±0.24	p<0.01
4 nap	1	4	p<0.001	2±0.55	ns	1	p<0.01
5 nap	1	3.8±0.2	p<0.001	2.2±0.73	ns	1	p<0.01
6 nap	1	3±0.32	p<0.001	2±0.55	ns	1	p<0.01
7 nap	1	2.2±0.22	p<0.001	1.6±0.67	ns	1	p< 0.05
Open-field							
Keresztezés	117.4±2.77	75.8±6.09	p<0.001	98.4±11.45	ns	90±15.99	ns
Szőrtisztítás	33±3.61	19.8±1.39	p<0.001	28.6±2.5	ns	30.6±4.37	p<0.05
Ágaskodás	1.4±0.93	1.2±0.97	ns	0.6±0.24	ns	1.2±0.73	ns
Elevated plus-maze							
Nyitott karba behajolás	6±1.58	10.4 ± 0.51	p<0.05	7±1.13	p<0.05	6.6±1.21	p<0.05
Nyitott karba belépés	4.4±1.21	2.6±0.87	ns	3.6±0.26	ns	3.2±0.66	ns
Nyitott karban töltött idő (mp.)	46.8±10.17	1.6±0.98	p<0.01	78.8±2.11	< 0.01	68±13.67	0.01
Zárt karban töltött idő (mp.)	253.2±10.17	298.4 ± 0.98	p<0.01	221±2.11	< 0.01	232.2±13.67	0.01
Szőrtisztítás zárt karban	17.6±0.98	12.6±0.51	p<0.01	12.2±1.18	ns	15.4±2.16	ns

9. táblázat. A magatartás-vizsgálatok statisztikai elemzésének összegzése.

A szorongási szintet és a motoros teljesítményt is mérő porond ("open field") 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 kezeltekben kizárólag a szőrtisztítás (grooming) számában volt szignifikáns javulás (9. táblázat).

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 szőrtisztítás ideje közt. Az L-2286 kezelt állatok szorongási szintje szignifikánsan alacsonyabbnak adódott, mint a vivőanyag kezelteké: szignifikánsan több időt töltöttek a nyitott-, és kevesebbet a zárt karban.

A közvetlenül trauma után kezelt állatok az ál-operáltakhoz képest is –bár nem szignifikánsan- több időt töltöttek a nyitott karokban. A vivőanyaggal kezelt állatok és a 30 perccel a trauma után kezeltek között a nyitott karba benézések száma, a nyitott karokban és a zárt karokban eltöltött időtartam vonatkozásában volt szignifikáns eltérés.

Következtetések

A Marmarou-féle impakt akcelerációs modell okozta diffúz agy-szerkezeti károsodás korábbi vizsgálatok szerint egyúttal a motoros és magatartási/kognitív funkciók károsodását is eredményezi^{102,285}. A DAI korábban részletezett kórfolyamatai közül a neurofilament kompaktációt és az axoplazmaticus transzport zavarát jelző IHC marker alkalmazásával vizsgáltuk a PARP-inhibitor L-2286 hatékonyságát. A vizsgálatok eredménye igazolta, hogy mindkét marker alapján szignifikánsan csökkent az axonkárosodás mértéke a motoros pályarendszert reprezentáló medulláris pyramisban a CSpT illetve a vastagabb, döntően szenzoros információt közvetítő MLF-rostokban.



34. ábra. APP-IR axonszakaszok a a CSpT-ben vivőanyag (A) illetve PARP-inhibitor kezelt állatban (B). (IA-koponyasérülés, két órával a trauma után történt IHCfeldolgozás). Az L-2286 kezelt illetve vivőanyagot kapott állatok axon-morfológiája nem tér el, szembeötlő ugyanakkor a jelentősen csökkent axon-denzitás a PARP-inhibitort kapott állat esetében.

Az APP-IR és RMO-14-IR axonok denzitásának eltérő mértékű csökkenése ismét –közvetettmegerősítését adta annak a megfigyelésnek, hogy az axonkárosodás heterogén jelenség, mely nem minden tengelyfonatban jelenti ugyanazon kórfolyamatok aktiválódását^{148,259}. Ez a megfigyelés ismét alátámasztja, hogy az igazságügyi orvostani gyakorlatban évtizedek

óta a DAI egyedüli markerének tartott APP-kimutatása messze alulbecsülheti a károsodott axonok számát, sőt, esetleges 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 (egyensúlyozás, spontán lokomotoros aktivitás), és nagymértékben csökkenteni a trauma után kialakuló szorongás szintjét (sztereotip magatartások száma, nyitott karokban töltött idő a keresztpalló tesztben), azaz összességében javítja a trauma utáni funkcionális kimenetelt.

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^{58, 117, 138}, jelen vizsgálatainkkal nem megválaszolható. E kérdés részletes elemzéséhez indokoltak további, például laterális folyadék-perkussziós modellben végzett vizsgálatok, ahol a PARP-inhibitor fokális károsodásra gyakorolt hatását is elemezhetjük.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Eredményeink a koponyasérülés kiváltotta diffúz axonkárosodás kóreredetének megértését, patobiologiai 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 alapkutatási munka eredményeként alkalmazott klinikai kutatásokat indítottunk el (proteolytikus biomarkerek) illetve klinikai fázisba került gyógyszerkísérletek elvi alapjait raktuk le (cyclosporin-A).

A munkának otthont adó neuropatologiai 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:6.3./):

1., Fény- és elektronmikroszkópos IHC bizonyítékot szolgáltattunk arra a régi feltevésre, hogy a DAI kórfolyamatában a strukturális fehérjéket bontó cisztein 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 folyamatában a fent hivatkozott fehérjebontó folyamatok nem "minden vagy semmi" jellegű, irreverzibilis aktiválódást mutatnak, hanem időben és az axon-cylinderen belül

ultrastrukturálisan is jól meghatározott, "kompartmentalizált" forgatókönyv szerint zajlik a proteolízis.

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 Ca²⁺-indukálta, calpain-mediálta spectrin-fehérje lebontás és a diffúz axonkárosodás klasszikus markereinek, azaz az axoplazmatikus transzport zavarát mutató APP akkumulációnak és a neurofilamentumok kompaktálódásának kolokalizációját igazolták, a citoszkeletális 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 elektronmikroszóposan 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 költséghatékonyabb, megbízhatóbb, jobb jel/zaj (specifikus/háttér-festés) arányát is biztosítani.

Vizsgálataink további bizonyítékot szolgáltattak 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 szolgáltattunk 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 Ca²⁺-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 Ca²⁺ 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 kihasított 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 gyermekszindróma esetén és új adatokkal szolgálnak a spondylotikus 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., Alapkutatási 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.

Vizsgálataink alapján a súlyos koponyasérültek neuro-intenzív monitorozásában potenciálisan hasznosítható, a terápia személyre szabását elősegítő biomarker család azonosítására nyílhat lehetőség; e feltételezést nemzetközi kollaborációban vizsgáljuk tovább (*9, 10, 11, 12, 13, 16*).

12., A Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis létrehozásával országosan egyedülálló ellátásauditálási 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 nyerhetők, 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 (dózis illetve út) 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, axonkárosodában 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, s ez a későbbi eredményes 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 diffúz axonális károsodást 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 szolgáltattunk, hogy ez az axono-protektív hatás a funkcionális kimenetel javításában is megnyilvánul, amennyiben a PARP-inhibitor kezelt állatok koponyaagysérülés utáni motoros aktivitása és szorongási szintje szignifikáns javulást mutat a kontrollokéhoz képest.

Eredményeink ismételten igazolják, hogy a diffúz agysérülés kórfolyamatában az energia háztartás helyreállítása illetve a lokális energia háztartás fenntartása kulcsszerepet játszhat (22).

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. 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
6.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	44,768

PhD fokozat megszerzése utáni közlemények:	39,178
PhD fokozat megszerzése előtti közlemények:	5,590

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

7., **Büki A.,** Czeiter E., Farkas O., Zsombok A., Pál J., Dóczi T., Povishock 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. Kovesdi 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 Povishock 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/Ideggyogy 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., Szellar 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 injuryMolecules 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 n head injury: An immunhistochemical and behavioral study.
International Journal of Molecular Sciences 2010;11(4) 1253-68.

6.4. 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., Vimláti L., Pál J., Büki A.,
Dóczi T.: Subdurális vérzéssel kezelt betegek halálozási viszonyait befolyásoló tényezők.
(Predictive factors for lethal outcome in subdural haemorrhage.) Clin Neurosci/Ideggyogy 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] Ideggyogy Sz. 2007 Nov 30;60(11-12):480-8. Hungarian.

6.5. 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

6.6. 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/Ideggyógyászati Szemle, 1994;
47:161-163.

2.,**Büki A.,** Horváth Z., Kövér F., Vetõ 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., Vetõ F., Dóczi T.: Subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis as a cause of occlusive hydrocephalus. (in Hungarian) [Sclerosis tuberosához 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 Kalcium -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., Vetõ 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.,** Vetõ, F., Horváth, Z., Sándor, J., Dóczi, T. Transcranial Dopplerdetermined 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.

6.7. Könyvfejezetek:

 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. Buki:** 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. Buki**: 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. Buki 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.

Büki A., Barzó P.: 25.fej. A központi idegrendszer sebészete. In: Sebészet 7.átdolg. kiad.,
 Szerk.: Gaál Cs. Medicina, 2010. In Press, Budapest,

7. IRODALOM

- 1. Surgical management of penetrating brain injury. J Trauma 51:S16-S25, 2001
- 2. Adams JH: Diffuse axonal injury in non-missile head injury. Injury 13:444-445, 1982
- Adams JH, Doyle D, Ford I, et al: Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. Histopathology 15:49-59, 1989
- Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA: Akceleráció n induced head injury in the monkey. II. Neuropathology. Acta Neuropathol Suppl (Berl) 7:26-28, 1981
- Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA: Head injury in man and experimental animals: neuropathology. Acta Neurochir Suppl (Wien) 32:15-30, 1983
- 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
- Arimura A: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. Jpn J Physiol 48:301-331, 1998
- Atlasz T, Babai N, Kiss P, et al: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal laesion in rats. Gen Comp Endocrinol 153:108-114, 2007
- 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
- Balentine JD: Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. Lab Invest 39:254-266, 1978
- Balestreri M, Czosnyka M, Chatfield DA, et al: Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:161-162, 2004

- Banik NL, Chakrabarti AK, Hogan EL: Effects of detergents on Ca(2+)-activated neural proteinase activity (calpain) in neural and non-neural tissue: a comparative study. Neurochem Res 17:797-802, 1992
- Banik NL, Matzelle DC, Gantt-Wilford G, et al: Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. Brain Res 752:301-306, 1997
- 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 neurotropin PACAP. Exp Neurol 151:116-123, 1998
- Barr RM GAaLT: Craniofacial Trauma. in Brant WEaHCA (ed): Fundamentals of Diagnostic Radiology . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006,
- Bartus R: The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common cytotoxic pathway. Neuroscientist 3:314-327, 19970
- 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
- Bennett M, O'Brien DP, Phillips JP, et al: Clinicopathologic observations in 100 consecutive patients with fatal head injury admitted to a neurosurgical unit. Ir Med J 88:60-2, 59, 1995
- Berger RP: The use of szérum biomarkers to predict outcome after traumatic brain injury in adults and children. J Head Trauma Rehabil 21:315-333, 2006
- 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
- Beutner G, Ruck A, Riede B, et al: Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore.
 FEBS Lett 396:189-195, 1996

- 22. Blumbergs PC: *Head injury*, in Reilly PLaBR (ed): Pathology. London: 2005, pp 41-72
- Blumbergs PC, Jones NR, North JB: Diffuse axonal injury in head trauma. J Neurol Neurosurg Psychiatry 52:838-841, 1989
- 24. 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
- 25. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7162-7166, 1995
- 26. 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
- Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation. J Neurotrauma 24 Suppl 1:S7-13, 2007
- Buki, A. and Barzo, P. A központi idegrendszer sebészete. In: Sebészet 7.átdolg.kiad., Szerk.: Gaál Cs.Medicina. 2009. szeptember ("in press")
- 29. 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
- 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
- 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

- 32. Buki A, Povlishock JT: All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. Acta Neurochir (Wien) 148:181-193, 2006
- 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
- 34. Burkle A: Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. Bioessays23:795-806, 2001
- 35. Carafoli E, Molinari M: Calpain: a protease in search of a function? Biochem Biophys Res Commun 247:193-203, 1998
- 36. 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
- 37. Carson KA, Mesulam MM: Electron microscopic demonstration of neural connections using horseradish peroxidase: a comparison of the tetramethylbenzidine procedure with seven other histochemical methods. J Histochem Cytochem 30:425-435, 1982
- Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, et al: Temporal characterisation of pro- and antiapoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. J Clin Neurosci 9:565-572, 2002
- Cernak I, Vink R, Zapple DN, et al: The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. Neurobiol Dis 17:29-43, 2004
- 40. Chakrabarti AK, Banik NL, Lobo DC, et al: Kalcium -activated neutral proteinase (calpain) in rat brain during development: compartmentation and role in myelination.
 Brain Res Dev Brain Res 71:107-113, 1993
- Chakrabarti AK, Dasgupta S, Gadsden RH, Sr., et al: Regulation of brain m calpain Ca2+ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca2+ level. J Neurosci Res 44:374-380, 1996
- 42. Chan SL, Mattson MP: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. J Neurosci Res 58:167-190, 1999

- 43. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, et al: The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. **J Trauma 34**:216-222, 1993
- 44. Christman CW, Grady MS, Walker SA, et al: Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. **J Neurotrauma 11**:173-186, 1994
- 45. Clifton GL, Jiang JY, Lyeth BG, et al: Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 11:114-121, 1991
- 46. 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
- 47. 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
- D'Avella D eal: Detection of alpha-II Spectrin and Breakdown Products in Humans after Severe Traumatic Brain injury. CAEP/ACMU Scientific Abstract 2004 (Abstract)
- Davidson AM, Halestrap AP: Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar [Ca2+], but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. Biochem J 268:147-152, 1990
- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, et al: Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity.
 Proc Natl Acad Sci U S A 90:9808-9812, 1993
- Dawson TM, Steiner JP, Lyons WE, et al: The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin.
 Neuroscience 62:569-580, 1994
- 52. 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

- Diakowski W, Sikorski A: Brain spectrin exerts much stronger effect on anionic phospholipid monolayers than erythroid spectrin. Biochim Biophys Acta 1564:403-411, 2002
- 54. Diakowski W, Sikorski AF: Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids.Biochemistry 34:13252-13258, 1995
- 55. 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
- 56. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y: Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res 57**:1835-1840, 1997
- 57. Erb DE, Povlishock JT: Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat. Acta Neuropathol 76:347-358, 1988
- 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
- Fatouros PP, Marmarou A: Use of magnetic resonance imaging for in vivo measurements of water content in human brain: method and normal values. J Neurosurg 90:109-115, 1999
- Ferri KF, Kroemer G: Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat Cell Biol 3:E255-E263, 2001
- 61. Field AS, Hasan K, Jellison BJ, et al: Diffusion tensor imaging in an infant with traumatic brain swelling. **AJNR Am J Neuroradiol 24**:1461-1464, 2003
- Figiel M, Engele J: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. J Neurosci 20:3596-3605, 2000
- Fiskum G: Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. J Neurotrauma 17:843-855, 2000

- Foda MA, Marmarou A: A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. J Neurosurg 80:301-313, 1994
- 65. Folbergrova J, He QP, Li PA, et al: The effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone on bioenergetic state in substantia nigra following flurothyl-induced status epilepticus in rats. Neurosci Lett 266:121-124, 1999
- Formigli L, Papucci L, Tani A, et al: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 182:41-49, 2000
- 67. Formisano R, Carlesimo GA, Sabbadini M, et al: Clinical predictors and neuropsychological outcome in severe traumatic brain injury patients. Acta Neurochir (Wien) 146:457-462, 2004
- Frappier T, Derancourt J, Pradel LA: Actin and neurofilament binding domain of brain spectrin beta subunit. Eur J Biochem 205:85-91, 1992
- 69. Frechilla D, Garcia-Osta A, Palacios S, et al: BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. **Neuroreport 12**:919-923, 2001
- 70. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, et al: Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. J Neurosci 18:5151-5159, 1998
- Fromm L, Heath DL, Vink R, et al: Magnesium attenuates post-traumatic depression/anxiety following diffuse traumatic brain injury in rats. J Am Coll Nutr 23:529S-533S, 2004
- 72. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al: Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. J Neurosci 19:3414-3422, 1999
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, et al: Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 18:1239-1247, 1998

- Gallyas F, Zoltay G, Balas I: An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to contusing concussive head injury in the rat. Acta Neuropathol 83:394-401, 1992
- Gallyas F, Zoltay G, Horvath Z: Light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to post-mortem concussive head injury. Acta Neuropathol 83:499-503, 1992
- 76. Ganea D, Delgado M: Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. Crit Rev Oral Biol Med 13:229-237, 2002
- 77. 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
- Gennarelli TA, Graham DI: Neuropathology of the Head Injuries. Semin Clin Neuropsychiatry 3:160-175, 1998
- 79. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, et al: Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. **Ann Neurol 12**:564-574, 1982
- 80. 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
- 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
- 82. Ghajar J: Traumatic brain injury 1. Lancet 356:923-929, 2000
- Gleckman AM, Bell MD, Evans RJ, et al: Diffuse axonal injury in infants with nonaccidental craniocerebral trauma: enhanced detection by beta-amyloid precursor protein immunohistochemical staining. Arch Pathol Lab Med 123:146-151, 1999
- 84. Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, et al: Brain spectrin: of mice and men. Brain Res Bull 36:593-606, 1995

- 85. 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
- 86. 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
- Graeber MB, Moran LB: Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. Brain Pathol 12:385-390, 2002
- Graham DI, McIntosh TK, Maxwell WL, et al: Recent advances in neurotrauma. J Neuropathol Exp Neurol 59:641-651, 2000
- 89. Greenberg MS: Handbook of Neurosurgery. 1996, pp 10-26
- 90. Greenwood JA, Troncoso JC, Costello AC, et al: Phosphorylation modulates calpainmediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. J Neurochem 61:191-199, 1993
- 91. Griffiths EJ, Halestrap AP: Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from kalcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.
 Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. Biochem J 274 (Pt 2):611-614, 1991
- 92. Grofova I, Zhou M: Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. J Comp Neurol 395:359-379, 1998
- 93. 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
- 94. Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, et al: Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. J Neurochem 72:1019-1029, 1999

- 95. Hackbarth RM, Rzeszutko KM, Sturm G, et al: Survival and functional outcome in pediatric traumatic brain injury: a retrospective review and analysis of predictive factors 1. **Crit Care Med 30**:1630-1635, 2002
- 96. Halestrap AP, Davidson AM: Inhibition of Ca2(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. Biochem J 268:153-160, 1990
- 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
- Hamberger A, Huang YL, Zhu H, et al: Redistribution of neurofilaments and accumulation of beta-amyloid protein after brain injury by rotational akceleráció n of the head. J Neurotrauma 20:169-178, 2003
- 99. 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
- 100. Hankins L TKaYJ: Magnetic resonance imaging in head injury., in Narayan RKWJEaPJ (ed): Neurotrauma . 1999, pp 151-161
- Hayashi M, Inomata M, Saito Y, et al: Activation of intracellular kalcium -activated neutral proteinase in erythrocytes and its inhibition by exogenously added inhibitors.
 Biochim Biophys Acta 1094:249-256, 1991
- Heath DL, Vink R: Impact akceleráció n-induced severe diffuse axonal injury in rats: characterization of phosphate metabolism and neurologic outcome. J Neurotrauma 12:1027-1034, 1995
- 103. Holsinger T, Steffens DC, Phillips C, et al: Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. Arch Gen Psychiatry 59:17-22, 2002
- 104. Hong SC, Lanzino G, Goto Y, et al: Kalcium -activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. Brain Res 661:43-50, 1994

- 105. Horner MD, Ferguson PL, Selassie AW, et al: Patterns of alcohol use 1 year after traumatic brain injury: a population-based, epidemiological study. J Int Neuropsychol Soc 11:322-330, 2005
- 106. Hortobagyi T, Gorlach C, Benyo Z, et al: Inhibition of neuronal nitric oxide synthasemediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. Neuroscience 121:983-990, 2003
- Huisman TA, Sorensen AG, Hergan K, et al: Diffusion-weighted imaging for the evaluation of diffuse axonal injury in closed head injury. J Comput Assist Tomogr 27:5-11, 2003
- 108. 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
- 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
- 110. Ingebrigtsen T, Romner B: Biochemical szérum markers of traumatic brain injury. J
 Trauma 52:798-808, 2002
- Jafari SS, Maxwell WL, Neilson M, et al: Axonal cytoskeletal changes after nondisruptive axonal injury. J Neurocytol 26:207-221, 1997
- 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
- 113. Jorge RE, Robinson RG, Arndt S: Are there symptoms that are specific for depressed mood in patients with traumatic brain injury? **J Nerv Ment Dis 181**:91-99, 1993
- 114. Kampfl A, Posmantur R, Nixon R, et al: mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. J Neurochem 67:1575-1583, 1996

- 115. 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
- 116. Katahira MYKaA: The neuroprotective effects of PACAP on spinal cor injury (SCI) in rats. Regul Pept 15:49, 2003 (Abstract)
- 117. 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
- 118. Kim WK, Kan Y, Ganea D, et al: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. J Neurosci 20:3622-3630, 2000
- 119. 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
- 120. 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
- 121. 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
- 122. Kupina NC, Detloff MR, Bobrowski WF, et al: Cytoskeletal protein degradation and neurodegeneration evolves differently in males and females following experimental head injury. Exp Neurol 180:55-73, 2003
- 123. 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

- 124. 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
- 125. Kuroda S, Janelidze S, Siesjo BK: The immunosuppressants cyclosporin A and FK506 equally ameliorate brain damage due to 30-min middle cerebral artery occlusion in hyperglycemic rats. Brain Res 835:148-153, 1999
- 126. Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, et al: Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. FEBS Lett 323:151-154, 1993
- 127. Lakos S, Basbaum AI: Benzidine dihydrochloride as a chromogen for single- and double-label light and electron microscopic immunocytochemical studies. J Histochem Cytochem 34:1047-1056, 1986
- 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
- 129. LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, et al: Pharmacologic inhibition of poly(ADPribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 18:369-376, 2001
- Le TH, Gean AD: Neuroimaging of traumatic brain injury. Mt Sinai J Med 76:145-162, 2009
- 131. 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
- Leist M, Jaattela M: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2:589-598, 2001
- Leker RR, Shohami E: Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Res Brain Res Rev 39:55-73, 2002

- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, et al: The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta 1366:177-196, 1998
- 135. Levey AI, Bolam JP, Rye DB, et al: A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. J Histochem Cytochem 34:1449-1457, 1986
- Lewen A, Li GL, Nilsson P, et al: Traumatic brain injury in rat produces changes of beta-amyloid precursor protein immunoreactivity. Neuroreport 6:357-360, 1995
- Li Z, Hogan EL, Banik NL: Role of calpain in spinal cord injury: increased mcalpain immunoreactivity in spinal cord after compression injury in the rat. Neurochem Int 27:425-432, 1995
- 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
- Lighthall JW, Goshgarian HG, Pinderski CR: Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. J Neurotrauma 7:65-76, 1990
- 140. Lockshin RA, Zakeri Z: Caspase-independent cell deaths. Curr Opin Cell Biol 14:727-733, 2002
- Lockshin RA, Zakeri Z: Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol 36:2405-2419, 2004
- 142. 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
- 143. Mar A, Spreekmeester E, Rochford J: Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. Pharmacol Biochem Behav 73:703-712, 2002
- 144. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, et al: Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. N Engl J Med 336:540-546, 1997

- 145. 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
- 146. 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
- Marmarou A, Lu J, Butcher I, et al: IMPACT database of traumatic brain injury: design and description. J Neurotrauma 24:239-250, 2007
- 148. 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
- 149. 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
- 150. Martin D, Schoenen J, Lenelle J, et al: MRI-pathological correlations in acute traumatic central cord syndrome: case report. **Neuroradiology 34**:262-266, 1992
- Maxwell WL: Histopathological changes at central nodes of Ranvier after stretchinjury. Microsc Res Tech 34:522-535, 1996
- 152. 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
- 153. 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
- Maxwell WL, Irvine A, Graham, et al: Focal axonal injury: the early axonal response to stretch. J Neurocytol 20:157-164, 1991
- 155. Maxwell WL, McCreath BJ, Graham DI, et al: Cytochemical evidence for redistribution of membrane pump kalcium -ATPase and ecto-Ca-ATPase activity, and kalcium influx in myelinated nerve fibres of the optic nerve after stretch injury. J Neurocytol 24:925-942, 1995

- 156. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL: A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. **J Neurotrauma 14**:419-440, 1997
- 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
- 158. Maxwell WL, Watt C, Graham DI, et al: Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral akceleráció n of the head in non-human primates. Acta Neuropathol (Berl) 86:136-144, 1993
- 159. Mazzeo AT, Brophy G, Gilman CB, et al: Safety and tolerabilityof cyclosporin A in severe traumatic brain injury patients: results from a prospective, randomized trial. J Neurotrauma 26:2195-206, 2009
- McCracken E, Hunter AJ, Patel S, et al: Calpain activation and cytoskeletal protein breakdown in the corpus callosum of head-injured patients. J Neurotrauma 16:749-761, 1999
- 161. 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
- 162. McKenzie KJ, McLellan DR, Gentleman SM, et al: Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? Acta Neuropathol 92:608-613, 1996
- Meaney DF: Relationship between structural modeling and hyperelastic material behavior: application to CNS white matter. Biomech Model Mechanobiol 1:279-293, 2003
- 164. 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
- 165. Meaney DF, Smith DH, Shreiber DI, et al: Biomechanical analysis of experimental diffuse axonal injury. J Neurotrauma 12:689-694, 1995

- Medana IM, Esiri MM: Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. Brain 126:515-530, 2003
- 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
- 168. Montal M: Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade. Biochim Biophys Acta 1366:113-126, 1998
- Morio H, Tatsuno I, Hirai A, et al: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. Brain Res 741:82-88, 1996
- Murray CJ, Lopez AD: Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. Lancet 349:1436-1442, 1997
- 171. 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
- Nakagawa T, Yuan J: Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J Cell Biol 150:887-894, 2000
- 173. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, et al: Clinical trials in head injury. J Neurotrauma 19:503-557, 2002
- 174. 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
- 175. 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
- 176. Newcomb JK, Pike BR, Zhao X, et al: Altered calpastatin protein levels following traumatic brain injury in rat. **J Neurotrauma 16**:1-11, 1999

- 177. 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
- 178. Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, et al: Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. Neuroscience 75:993-997, 1996
- 179. 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
- 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
- 181. 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
- 182. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, et al: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway.Oncogene 17:3237-3245, 1998
- Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, et al: Axonal injury--a diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. Forensic Sci Int 95:67-83, 1998
- Okonkwo DO, Buki A, Siman R, et al: Cyclosporin A limits kalcium -induced axonal damage following traumatic brain injury. Neuroreport 10:353-358, 1999
- 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
- 186. 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

- 187. 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
- Pant HC: Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. Biochem J 256:665-668, 1988
- 189. Paterakis K, Karantanas AH, Komnos A, et al: Outcome of patients with diffuse axonal injury: the significance and prognostic value of MRI in the acute phase. J Trauma 49:1071-1075, 2000
- 190. Pelinka LE, Bahrami S, Szalay L, et al: Hemorrhagic shock induces an S 100 B increase associated with shock severity. Shock 19:422-426, 2003
- 191. Pelinka LE, Harada N, Szalay L, et al: Release of S100B differs during ischemia and reperfusion of the liver, the gut, and the kidney in rats. **Shock 21**:72-76, 2004
- 192. Pelinka LE, Toegel E, Mauritz W, et al: Szérum S 100 B: a marker of brain damage in traumatic brain injury with and without multiple trauma. Shock 19:195-200, 2003
- 193. 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
- 194. 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
- 195. 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
- 196. Pierce JE, Smith DH, Trojanowski JQ, et al: Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. Neuroscience 87:359-369, 1998

- 197. 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
- 198. 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
- 199. 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
- 200. 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
- 201. 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
- 202. 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
- 203. Pineda JA, Wang KK, Hayes RL: Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. Brain Pathol 14:202-209, 2004
- 204. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, et al: Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. Neurology 55:1158-1166, 2000
- 205. Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al: N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2508-2513, 1999
- 206. Porn-Ares MI, Samali A, Orrenius S: Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. Cell Death Differ 5:1028-1033, 1998

- 207. 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
- 208. 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
- 209. Povlishock JT: Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. Acta Neuropathol 70:53-59, 1986
- 210. Povlishock JT: Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. Brain Pathol 2:1-12, 1992
- Povlishock JT: Pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and man. Ann Emerg Med 22:980-986, 1993
- Povlishock JT: The future of combinational therapy in the treatment of traumatic brain injury. J Neurotrauma 26:923, 2009
- 213. Povlishock JT, Becker DP: Fate of reactive axonal swellings induced by head injury.Lab Invest 52:540-552, 1985
- 214. Povlishock JT, Becker DP, Cheng CL, et al: Axonal change in minor head injury. J
 Neuropathol Exp Neurol 42:225-242, 1983
- 215. Povlishock JT, Buki A, Koiziumi 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
- 216. 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
- 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

- 218. Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, et al: Impact akceleráció n injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. J Neuropathol Exp Neurol 56:347-359, 1997
- 219. 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
- 220. Quencer RM, Bunge RP, Egnor M, et al: Acute traumatic central cord syndrome: MRI-pathological correlations. Neuroradiology 34:85-94, 1992
- 221. Reglodi D, Lubics A, Tamas A, et al: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res 151**:303-312, 2004
- 222. 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
- 223. Roberts-Lewis JM, Savage MJ, Marcy VR, et al: Immunolocalization of calpain Imediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. J Neurosci 14:3934-3944, 1994
- 224. 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
- 225. 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
- 226. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, et al: Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. J Neurotrauma 25:719-738, 2008
- 227. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK: The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. **J Neurotrauma 15**:1047-1058, 1998

- 228. 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
- 229. Saatman KE, Zhang C, Bartus RT, et al: Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical laesion, or apoptosis. J Cereb Blood Flow Metab 20:66-73, 2000
- 230. Sabatini DM, Lai MM, Snyder SH: Neural roles of immunophilins and their ligands.Mol Neurobiol 15:223-239, 1997
- Salum C, Morato S, Roque-da-Silva AC: Anxiety-like behavior in rats: a computational model. Neural Netw 13:21-29, 2000
- 232. Sandor J, Szucs M, Kiss I, et al: [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage]. Ideggyogy Sz 56:386-395, 2003
- Schaan M, Jaksche H, Boszczyk B: Predictors of outcome in head injury: proposal of a new scaling system. J Trauma 52:667-674, 2002
- 234. Schlaepfer WW, Zimmerman UJ: Kalcium -activated proteolysis of intermediate filaments. Ann N Y Acad Sci 455:552-562, 1985
- 235. Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.Immunol Today 13:136-142, 1992
- 236. Schuhmann MU, Stiller D, Thomas S, et al: 1H-MR spectroscopic monitoring of posttraumatic metabolism following controlled cortical impact injury: pilot study.
 Acta Neurochir Suppl 76:3-7, 2000
- 237. Sehgal V, Delproposto Z, Haacke EM, et al: Clinical applications of neuroimaging with susceptibility-weighted imaging. J Magn Reson Imaging 22:439-450, 2005
- 238. 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
- 239. Shannon P, Smith CR, Deck J, et al: Axonal injury and the neuropathology of shaken baby syndrome. Acta Neuropathol 95:625-631, 1998

- 240. Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, et al: Markers of axonal injury in post mortem human brain. Acta Neuropathol 88:433-439, 1994
- 241. Sherriff FE, Bridges LR, Jackson P: Microwave antigen retrieval of beta-amyloid precursor protein immunoreactivity. **Neuroreport 5**:1085-1088, 1994
- 242. 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
- 243. Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, et al: Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. **Brain Res 839**:66-73, 1999
- 244. Siesjo BK, Bengtsson F: Kalcium fluxes, kalcium antagonists, and kalcium -related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab 9:127-140, 1989
- 245. Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, et al: Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. Acta Neurochir Suppl 73:7-13, 1999
- 246. 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
- 247. Siesjo BK, Siesjo P: Mechanisms of secondary brain injury. Eur J Anaesthesiol 13:247-268, 1996
- 248. Siman R, Baudry M, Lynch G: Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous kalcium -activated protease. **Proc Natl Acad Sci U S A 81**:3572-3576, 1984
- 249. Siman R, Noszek JC: Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. **Neuron 1**:279-287, 1988
- 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

- 251. Singleton RH, Povlishock JT: Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. J Neurosci 24:3543-3553, 2004
- 252. Singleton RH, Stone JR, Okonkwo DO, et al: The immunophilin ligand FK506 attenuates axonal injury in an impact-akceleráció n model of traumatic brain injury. J Neurotrauma 18:607-614, 2001
- 253. Singleton RH, Zhu J, Stone JR, et al: Traumatically induced axotomy adjacent to the soma does not result in acute neuronal death. J Neurosci 22:791-802, 2002
- 254. Skoglosa Y, Lewen A, Takei N, et al: Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type 1 after traumatic brain injury: comparison with brain-derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. Neuroscience 90:235-247, 1999
- 255. 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
- 256. 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
- 257. Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, et al: Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. **J Cell Physiol 178**:311-319, 1999
- 258. 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
- 259. 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

- 260. 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
- Strich SJ: Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 19:163-185, 1956
- 262. Strich SJ: Shearing of nerve fibers as a cause of brain damage due to head injury: A pathological study of twenty cases. Lancet 2:443-448, 1961
- 263. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR: Na(+)-Ca2+ exchanger mediates Ca2+ influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. Ann Neurol 30:375-380, 1991
- 264. Suehiro E, Singleton RH, Stone JR, et al: The immunophilin ligand FK506 attenuates the axonal damage associated with rapid rewarming following posttraumatic hypothermia. Exp Neurol 172:199-210, 2001
- Sullivan HG, Martinez J, Becker DP, et al: Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. J Neurosurg 45:521-534, 1976
- 266. 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
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. Biochim Biophys Acta 1366:151-165, 1998
- 268. Syntichaki P, Tavernarakis N: Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? EMBO Rep 3:604-609, 2002
- 269. Tabuchi A, Funaji K, Nakatsubo J, et al: Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. J Neurosci Res 71:504-515, 2003
- Takanashi Y, Shinonaga M: Magnetic resonance imaging for surgical consideration of acute head injury. J Clin Neurosci 8:240-244, 2001

- Tamas A, Lubics A, Lengvari I, et al: Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal laesion. Ann N Y Acad Sci 1070:570-574, 2006
- 272. Teasdale G, Jennett B: Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet 2:81-84, 1974
- 273. 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
- 274. Tolias CM, Bullock MR: Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? **NeuroRx 1**:71-79, 2004
- 275. Trost LC, Lemasters JJ: The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. J
 Pharmacol Exp Ther 278:1000-1005, 1996
- 276. Tymianski M, Tator CH: Normal and abnormal kalcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury.
 Neurosurgery 38:1176-1195, 1996
- 277. 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
- 278. 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
- 279. 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
- 280. 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
- 281. van LG, Saelens X, van GM, et al: The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. Cell Death Differ 9:1031-1042, 2002

- 282. Vaudry D, Chen Y, Ravni A, et al: Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). J Neurochem 83:1272-1284, 2002
- 283. 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
- 284. 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
- 285. 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
- 286. 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
- 287. Wang KK: Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci 23:20-26, 2000
- 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
- 289. 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
- 290. 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
- 291. Waxman SG: The Axon. New York: NY, Oxford University Press, 1995, pp 218-244

- 292. 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
- 293. Yaghmai A, Povlishock J: Traumatically induced reactive change as visualized through the use of monoclonal antibodies targeted to neurofilament subunits. J Neuropathol Exp Neurol 51:158-176, 1992
- 294. Yakovlev AG, Faden AI: Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. NeuroRx 1:5-16, 2004
- 295. Yamashima T: Ca2+-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. Cell Kalcium 36:285-293, 2004
- 296. Yoshimoto T, Siesjo BK: Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. **Brain Res 839**:283-291, 1999
- 297. Zagon IS, Higbee R, Riederer BM, et al: Spectrin subtypes in mammalian brain: an immunoelectron microscopic study. **J Neurosci 6**:2977-2986, 1986
- 298. Zamzami N, Kroemer G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.Nat Rev Mol Cell Biol 2:67-71, 2001
- Zhou M, Grofova I: The use of peroxidase substrate Vector VIP in electron microscopic single and double antigen localization. J Neurosci Methods 62:149-158, 1995
- 300. Zoratti M, Szabo I: The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta 1241:139-176, 1995