

Opponensi vélemény Büki András Zoltán „Fehérjebontó folyamatok diffúz agysérülésben: kísérletes vizsgálatoktól a klinikai felhasználásig” c. MTA doktori értekezéséről.

Dr. Fekete Károly

2011

Az értekezés tartalomjegyzékkel és irodalmi hivatkozásokkal együtt 137 oldal terjedelmű. Irodalom jegyzék és közlemények felsorolással együtt 7 fejezetet foglal magában.

A tényleges tudományos munka a 9. oldaltól a 103-ik oldalig tart.

A **bevezetésben** kiemeli, hogy a baleseti halálozás az élet első 40 évében a többi halálok között első helyen áll. A mortalitási statisztikában Magyarországon a trauma, ezzel együtt a súlyos agysérülés miatti halálozás a harmadik helyet foglalja el. Itt szól kutató munkájának indítékáról, külföldi tanulmányúton szerzett tapasztalatáról, egy hazai munkacsoporttal közösen készített felmérés eredményéről, amelyben megrendítő adattal támasztotta alá a dolgozat témájának aktualitását és fontosságát, nevezetesen: 2003-ban a magyarországi subdurális haematómát elszenvedett sérültek halálozása duplája a nemzetközi statisztikákban fellelt adatokkal összevetve!

Az ellátás szervezés javítása és a pontosan kidolgozott kezelési irányelvek a korszerű kezelést biztosító országokban a halálozás 50 %-os csökkenéséhez vezettek! Tudományos tevékenységében a fentiekhez hasonló eredmények elérését tűzte ki céljául. Feladatként tűzte ki az agysérültek diffúz axonális károsodásában szerepet játszó fehérjebontó folyamatok vizsgálatát, monitorozását.

Az ezt követő **1. fejezet** irodalmi áttekintéssel vezeti be a tudományos munka szempontjából fontosnak tartott megállapításokat, kutatásokat. Hogy milyen nagyságrendű sérüléscsoportról van szó akkor, ha agysérültekről beszélünk, elegendő az USA adataira hivatkozni, ahol évente 1,4 millió baleseti eredetű agysérülést regisztrálnak, és 5,3 millió ember él ilyen jellegű sérülést követő agykárosodással. Hazai adataink is vannak Csepregi és munkatársai tollából. 2007-es adat: évi 700 haláleset volt írható ebben az évben e sérüléstípus számlájára! Ez az összes agysérült 54 %-a volt! A túlélők 45 %-ában maradtak vissza maradványtünetek, és csak minden negyedik túlélő térhetett vissza egészségesen a családjához, munkájához, a társadalom hasznos tagjaként.

A munka fókuszában a traumát követő és kezeléssel befolyásolható másodlagos agykárosodás vizsgálata, elemzése áll.

Ismerteti a klinikumban ma is alkalmazott koponya sérülések osztályozását, a GCS kritériumain alapuló súlyossági fokozatokat. Kitér a diffúz axonális károsodás (DAI) okaira, klinikai tüneteire, képalkotó eljárásokkal, még élőben történő kimutatására. A DAI ugyanis mintegy 50 %-ban felelős a tartós tudatzavar fennmaradásáért, és 30 %-ban a nem térfoglaló jellegű agysérüléseknél a mortalitásért.

Részletesen kitér az axonkárosodás morfológiai vizsgálatokkal kimutatott formájára, az axonballon képződésre. Mivel az axonballon képződés – a korábbi felfogással ellentétben – nem a trauma pillanatában következik be, hanem csak néhány óra, vagy nap alatt, van remény arra, hogy megfelelő kezeléssel kialakulása akár elkerülhető is legyen. Így megelőzhető a ballontól distálisan kialakuló Waller féle degeneráció.

Kitér a calpain enzim túlindukciója, azaz a Ca<sup>2+</sup> koncentráció miatt létrejövő aktiválódására, és arra, hogy a calpain antagonisták a kísérleti állatok funkcionális felépülésére jó hatással

voltak. A disszertációban a jelölt ilyen formán a Ca<sup>2+</sup> indukálta fehérje bontás vizsgálatát, annak folyamatát tűzte ki céljául.

Irodalmi hivatkozásként szól az apoptotikus enzimek szerepéről, a programozott sejthalál és necrosis szerepére, amely az agyszövetet ért trauma következménye lehet.

Az **1.7. fejezet**részben kitér olyan kísérleti adatokra és klinikai megfigyelésekre, amelyek a traumát követő (lassulás-gyorsulás, centrifugális erő) DAI kialakulását idézték elő. A klinikusok számára ismert körkép a „megrázott gyermek” szindróma ebbe a csoportba tartozik, a nyaki gerincvelői szakasz axonkárosodása tekintetében.

Az **1.8. fejezet**ben kitér azokra a neuro-protektív szerekre, amelyeknek adagolásától a DAI kialakulásának elmaradását illetve csökkentését várták. A neuro-protektív szerek hatásosságának vizsgálata azonban a jelenlegi vizsgáló módszerek nem kellő finomsága, alacsony érzékenysége miatt csak bizonyos határok között lehetséges. Így a GCS, az intracranialis nyomásmérés monitorozása, vagy különböző ikonográfias módszerek, így a pl. a CT nem eléggé specifikusak és szenzitívek. Nem alkalmasak a diffúz, agyban zajló biokémiai folyamatok monitorozására az MRI, és a vérgáz értékek vizsgálata sem.

Doktorjelölt jelzi irodalmi összefoglalójában azt is, nincsenek megfelelő ágy melletti „point of care” módszerek, amelyek az alkalmazott kezelés, vagy prognózis kimenetelét lehetővé tennék. Mivel hiányoznak a fenti kritériumnak megfelelő eljárások - az egyes fehérjebontó folyamatok után keletkező lebontási termékek kimutatására, vizsgálatára kell fókuszálni - veti fel a lehetséges megoldást a jelölt. Ez az anyag a spectrin, amely mind a caspase 3, mind a calpain szubsztrátja. Koponyasérülés után ugyanis spectrin-degradációs termékek szaporodnak fel a liquorban, sőt korrelációt figyeltek meg ennek mennyiségét illetően a trauma erősségével is.

A diffúz axonális károsodás kialakulási folyamatába történő belépés terápiás lehetősége a nekrotikus és apoptotikus enzimek aktiválódásának szelektív blokkolása több támadáspont egyidejű alkalmazását jelenti, írja az **1.9. fejezet**ben. Itt ír a közepes fokú, 32 C° hypothermia axonális védelmet nyújtó hatásáról, (erre vonatkozik opponens első kérdése is, lásd később!). Mint lehetséges kezelési módszer a cyclosporine-A (immunoszupresszor) adagolása, a sejtek mitochondriális károsodást csökkentő hatása miatt, valamint az immunophyllinek (calcineurin gátló)– hatásmechanizmusának összefoglalása is ebben a fejezetben szerepel.

Az előbbieken felsorolt, főleg biokémiai folyamatok leírását tartalmazó 35 oldalas irodalmi áttekintést követően részletezi kutatási célkitűzéseit a **II. fejezet**ben, összesen 7 pontban összefoglalva.

A disszertáció **3. „Anyag és Módszer”** része kimerítő pontossággal részletezi az állatkísérletek leírását. A szerző és munkatársai a kiválasztott állatokat (patkányokat) a Magyar Állatetikai Bizottság előírásai és a virginiai, e kísérletekhez előírt megfelelő szabályozások szerint használták.

Standardizált módszerekkel végezték az impakt akcelerációs koponya trauma létrehozását, amellyel az agytörzsön átvonuló hosszúpályák axonális károsodását idézték elő. Centrális folyadék perkussziós modellel pedig a diffúz és a göccos agykárosodás kiváltására került sor.

A fenti traumán átesett kísérleti állatokat különböző módon vizsgálták, illetve dolgozták fel, változatos terápiás célú anyagok adása mellett, majd elvégezték a kivett agyszövet immunhisztokémiai feldolgozását.

A vizsgálati anyagokat digitális képeken tárolták és elemezték.

A kísérleti állatok viselkedés vizsgálatáról a **3.10. fejezet**részben számol be. A koponya trauma előtt betanított patkányok egyensúlyozási tesztjét 7 napon át vizsgálták. Megfigyelték az állatok pszichés viselkedését is, az agysérülést követő 6 napon át.

A **harmadik fejezet** tartalmazza a Pécsi Súlyos Koponyasérült Adatbázis anyagának feldolgozását is. Ennek 2002-ben kezdődő létrehozása a jelölt érdeme. 2009-ig 341 súlyos

koponyasérült monitorozott értékei, élettani paraméterei kerültek a komputerbe. A súlyos agysérültek liquormintáinak vizsgálatán felül 99 esetben az elkészített primer MR és CT vizsgálatok képeit elemezték, annak kiderítésére, hogy a másodlagos károsodások a műtéti tevékenység miatt, vagy az agysérülés következtében alakultak ki.

Az **Eredmények és megbeszélés fejezetben (4)** írja le következtetéseit. A patkányokon végzett koponya traumát követő axonális károsodás hátterében az idő előre haladtával kialakuló a neurofilamentumok kompaktálódása, mitochondriális dazadás, myelin hüvely fellazulás és periaxolemmális ür képződése áll, és ezt vizsgálataival igazolja is.

Érdekes megállapítás, hogy kóros axon károsodások markáns klinikai tünetek nélkül is bekövetkezhetnek, nem súlyos koponyasérüléseket követően. Magától értetődő azon megállapítása, hogy a kiváltó trauma nagysága és az eltelt idő növekedése az axonkárosodás mértékével egyenesen arányosan nő.

Nemcsak agykoponyán belüli, hanem gerincvelői DAI kimutatására is végzett állatkísérleteket, akcelerációs-decelerációs mechanizmussal előidézett trauma hatására. Ezeknél az eseteknél a craniospinális átmenet, a cervico-thoracalis, valamint thoraco-lumbalis átmenet axonális elváltozásait vizsgálta. Megállapítása ugyanaz volt, mint az intracranialis területnél, vagyis nagyobb trauma hatásaként komolyabb mértékű axonális károsodás következett be, és ez az idő előre haladtával súlyosbodott.

A fenti megállapítások esszenciája a klinikusok számára : a „minor” traumákat is komolyan kell venni, mert ez későbbi, postcommotios syndromát okozhat. *Ehhez kapcsolódik a jelöltnék szóló második kérdésem (lásd később.)*

A gerincvelői axonális károsodásra vonatkozó vizsgálati eredményei magyarázatot adnak a megrázott gyermek syndroma strukturális károsodására, és az időskori spondylotikus betegek myelopátiás neurológiai károsodással járó elváltozásaira is. Jelölt rámutat arra, hogy az ilyen degeneratív gerincelváltozásban szereplő idős betegek arcra esésekor bekövetkező centrális gerincvelői lézió hátterében nem haematomyelia, azaz bevérzés szerepel, hanem axonális károsodás.

A **IV. alfejezet rész**, a pécsi súlyos koponyasérült adatbázis feldolgozása már az alkalmazott klinikai kutatás területére vált át.

Mivel jelenleg a koponya sérültek prognosztikai vizsgálatára illetve kezelésük hatásosságára alkalmas, biztonsággal alkalmazható diagnosztikai anyag nem áll rendelkezésünkre, disszertáns reményeket fűz ahhoz, hogy a caspain és caspase mediált fehérjebontó folyamatok aktiválódása során keletkező termékek kimutatására a már régen várt biomarkert sikerül a mindennapi gyakorlatba alkalmas módon előállítani. Ehhez a pécsi adatbázis liquormintái rendelkezésükre állnak. Szignifikáns különbséget talált ugyanis az adatbázisban szereplő liquorminták elemzésénél a koponya traumát elszenvedetteknél a caspase specifikus spectrin degradációs termékek mennyiségében. Az adatbázis betegeinek liquor elemzése és a kísérleti állatoknál leszűrt tapasztalatok során ugyanazokat a fehérjebontó folyamatokat találta, ez pedig egy potenciális biomarker előállításának lehetőségét valóra váltotta. Megnyílt tehát az út a diagnosztikára és a súlyos koponyasérülések prognózisára is alkalmazható szérum teszt kifejlesztéséhez.

A vizsgálatok klinikai képpel történő összevetését a CT felvételek elemzésével finomították. A képek értékelésénél összehasonlító digitális elemző módszert is alkalmaztak, amely szignifikánsabb jobb szenzitivitást mutatott a hagyományos CT filmértékeléssel összehasonlítva, és finomabb prognosztikai értéke is volt.

A különböző axonoprotektív szerek kísérletes vizsgálatát az **V. , VI. és VII.** eredmények értékelése alfejezetben írja le. Többek között kitér a PACAP (apoptotikus és gyulladásos mediátorok gátlóanyaga) adásának kedvező eredményeire, abban az esetben, ha a szert intraventricularisan juttatta az állatkísérletek során az agyba. Megállapítást nyert a PARP

inhibítorral végzett utókezelés hatásossága is, amely összességében javította a kísérletes állatoknál a traumát követő funkcionális kimenetelt.

Az 5. összefoglalás és gyakorlati jelentőség fejezetben sorra veszi a célkitűzéseknél felsorolt feladatokra született válaszokat, eredményeket.

A disszertáció összesen 18 pontban foglalja össze eredményeit, saját kutatásainak értékelését, azok saját tudományos megállapításait.

A doktori disszertáció különösen kiemelkedő saját eredményei:

- Elsőként írja le a DAI kialakulásában szerepet játszó calpain aktoválódás térbeli és időbeli sajátosságait, annak progresszív előrehaladását, és a kialakult időablak terápiásan kihasználható jelentőségét.
- Új, költséghatékony, ugyanakkor hatásos fluoreszcens mikroszkópos szövettani technikát dolgozott ki az axonkárosodás vizsgálatára.
- Kísérletes agysérüléssel modellben károsodott axonokban caspase aktiválódást mutatott ki fénymikroszkópos és finomszerkezeti vizsgálatokkal.
- Új terápiás lehetőséget talált a cyclosporin A alkalmazására súlyos koponyasérült betegek esetében.
- Kimutatta, hogy súlyos axonális károsodás nemcsak az agykoponyán belül, hanem a távoli gerincvelői szakaszokon is fellép. Magyarozattal szolgál a megrázott gyermek szindróma keletkezésére, és az időskori spondylos gerinc mellett létrejövő centrális gerincvelői szindróma kialakulásának patomechanizmusára.
- liquorvizsgálati elemzéssel emberben elsőként írták le a spectrin nevű strukturfehérje agyvízben történő megjelenését agysérülést követően.
- Létrehozta Magyarországon elsőként és ma is egyedülállóan működő Súlyos Koponyasérült Adatbázist.
- Elsőként mutatta ki a PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid) axonkárosodást kivédő hatását, lehetőséget nyújtva annak klinikai kipróbálására.

Oppenens kérdései összefoglalva a jelölthöz:

1. Az 1.9. fejezet részben ír a közepes fokú, (32°) hypothermia kedvező hatásáról az axonális károsodás kivédésére. Gyakorló traumatológusként várom válaszát kérdésekre. Mivel a polytraumatizált betegek döntő többsége koponyasérülést is elszenvedett, és a haemorrhagiás shock kezelésének egyik sarkalatos pontja az acidózis kivédése mellett a kihűlés elleni védelem, ez a hypothermia kedvező hatásának alkalmazását elvben kizárja. Hogyan látja ennek az ellentmondásnak a kiküszöbölését?

2. Igazságügyi orvosi vélemény kialakításához eddigi kutatásai alapján tud-e vagy ajánlhat-e olyan klinikumban is használható módszert, amely a szubjektív, betegek által előadott tünetek mellett igazolhatja a postcommotios syndroma jelenlétét? (4. fejezet) Utal ugyan arra, hogy MRI-vel illetve biomarker vizsgálatokkal szerzett tapasztalatai klinikai kipróbálásra is kerülhetnek, azonban alkalmazásuk mindaddig még nem került bevezetésre.?

2. Az adatbázisban csak monotraumas, tehát izolált koponyasérültek szerepeltek-e, vagy agysérülést elszenvedett polytraumatizáltak is? Mennyiben befolyásolhatják eredményeiket, méréseiket az egyéb lágyrész sérülések, haemorrhagiás shock stb. Ha igen, nem lett volna szükség polytrauma modellező kísérletre is a patkányok esetében?

3. A Rotterdam score elemei között a kamrába törő vérzés, traumás subarachnoidealis vérzés és a ciszternák eltűnése méréseik szerint jobb prognosztikai értékkel bírt, mint a Rotterdam score. Ez is a digitális képelemzés finomabb érzékenységének tudható be? És ha a digitalizált feldolgozás értékeit helyezte be a Rotterdam score-ba is érvényes maradt-e megállapítása: „A Rotterdam score elemei közül ..... mind pedig a ciszternák eltűnése szoros összefüggést mutatott a kimenetellel, ugyanakkor ezek külön-külön pontosabb diagnosztikai értéket adtak, mint összegezett Rotterdam score-ként használva.”

4. Azt írja, a klinikusok nehezen fogadják el a digitális képelemzés módszerét és eredményeit. Mint klinikus kérdezem, nem fenyeget-e az a veszély, hogy teljesen elgépiesedik a klinikai diagnosztika, és egyre kevésbé tudjuk saját tapasztalataink alapján a nyert képeket értékelni? Megállapításához mit hasonlított össze? A radiológus által leírt leletet, vagy minden képet saját maga tekintett át? Volt-e szubjektivitás a CT felvételek értékelésekben (pl. több, különböző kvalitású értékelő orvos végzezte...)?

5. Utolsó, inkább formai jellegű kérdés: miért váltott át a dolgozatban a decimális beosztásból római számokra és abc alapú felosztásra az eredmények értékelése című 4. fejezetben? A decimális tagozódás bőven lehetőséget nyithatott volna a disszertáció formai egységesítésére.

**Mindezen megállapítások és kérdések a tudományos értekezés értékét nem rontják, így a fenti kísérletes és klinikai munka eredményei alapján a doktori munka tudományos értékét elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez, így a mű elfogadását és nyilvános vitára kitűzésére javaslom.**

2012. január 2.

Dr. Fekete Károly