

# **Hisztopatológiai és kísérletes terápiás vizsgálatok súlyos koponya-agysérülés kísérletes modelljeiben**

Doktori (PhD) értekezés

**Kövesdi Erzsébet**

Témavezető: Dr. Büki András

Elméleti Orvostudományok, Doktori Iskola vezetője: Dr. Szolcsányi János

Kísérletes Neurológia, Programvezető: Dr. Gallyas Ferenc (2006.03.31-ig)

Klinikai Orvostudományok, Doktori Iskola vezetője: Dr. Komoly Sámuel

Klinikai Idegtudományok, Programvezető: Dr. Komoly Sámuel



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Idegsebészeti Klinika

2010

1. FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
2. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR .....	5
2.1. A koponyasérülés epidemiológiája.....	5
2.2. A baleseti agysérülések osztályozása .....	6
2.3. Diffúz axonális károsodás .....	7
2.3.1. Axon duzzadás/axonballon képződés (AD/B).....	8
2.3.2. Az ultrastrukturális (neurofilament) kompaktió (neurofilament compaction, NFC) .....	9
2.4. Diffúz idegsejt-károsodás („sötét” idegsejt képződés).....	11
2.5. Sejthalál mechanizmusok agysérülésben.....	13
2.6. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgálatok .....	14
2.6.1. Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polipeptid.....	14
2.6.2. A poli (ADP-ribóz)-polimeráz gátlása .....	15
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	17
4. AZ AGYALAPI MIRIGY ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) NEUROPRTEKTÍV HATÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA A CENTRÁLIS FOLYADÉK-PERKUSSZIÓS (CFP) PATKÁNY- MODELLEL VÉGZETT AGYSÉRÜLÉS ESETÉBEN .....	18
4.1. Bevezetés .....	19
4.2. Anyagok és módszerek.....	19
4.2.1. Kísérleti állatok .....	19
4.2.2. A centrális folyadék perkussziós modell kivitelezése patkányon .....	20
4.2.3. I.c.v. PACAP kezelés .....	21

4.2.4. Immunhisztokémia .....	21
4.3. Eredmények .....	22
4.4. Megbeszélés, következtetések .....	25
5. AZ „L-2286”-EGY ÚJ POLI (ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ INHIBITOR NEUROPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MARAMROU-FÉLE IMPAKT ACCELERÁCIÓS PATKÁNY MODELLEL VÉGZETT KOPONYATRAUMA ESETÉBEN .....	
5.1. Bevezetés .....	29
5.2. Anyagok és módszerek .....	30
5.2.1. Kísérleti állatok .....	30
5.2.2. Marmarou-féle impakt accelerációs modell patkányon.....	31
5.3. Immunisztokémia .....	31
5.4. Magatartásvizsgálatok .....	32
5.5. Eredmények .....	34
5.5.1. Immunhisztokémia .....	34
5.5.2. Magatartásvizsgálatok .....	37
5.6. Megbeszélés, következtetések .....	42
6. TRANZIENS FOKÁLIS AGYI ISZKÉMIA OKOZTA „SÖTÉT” IDEGSEJTEK SORSA NEM-NEKROTIKUS ES NEM EXCITOTOXIKUS SZÖVETI KÖRNYEZETBEN: NEUROBIOLÓGIAI KÖVETKEZTETÉSEK.....	
6.1. Bevezetés .....	45
6.2. Anyagok és módszerek.....	45
6.2.1. Kísérleti állatok .....	45

6.2.2. Patkány tranziens fokális agyi iszkémia modell.....	45
6.2.3. Szöveti feldolgozás.....	46
6.3. Eredmények.....	47
6.3.1. Fénymikroszkópos megfigyelések.....	47
6.3.2. Elektronmikroszkópos megfigyelések.....	51
6.4. Megbeszélés, következtetések.....	55
7. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	57
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ PUBLIKÁCIÓK.....	59
9. EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK.....	60
10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	63
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	64

## 1. FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD/B	axonduzzadás/axonballon-képződés
AIF	apoptózis-indukáló faktor (apoptosis-inducing factor)
APP	amiloid prekursor protein (amyloid precursor protein)
CSpT	kortikospinális pálya (corticospinal tract)
CT	komputer tomográfia (computed tomography)
DAB	diamino-benzidin
DAI	diffúz axonális károsodás (diffuse axonal injury)
DVI	diffúz vaszkuláris károsodás (diffuse vascular injury)
ER	endoplazmatikus retikulum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FP	folyadék perkusszió (fluid percussion)
GCS	Glasgow kóma skála (Glasgow Coma Scale)
i.c.v.	intracerebroventrikuláris
MLF	mediális hosszanti köteg (medial longitudinal fascicle)
MRI	mágneses rezonanciás képalkotás (magnetic resonance imaging)
NAD	nikotinamid adenin-dinukleotid
NFC	neurofilament kompakció (neurofilament compaction)
PACAP	agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenilate cyclase activating polypeptide)
PARP	poli (ADP-ribóz)-polimeráz
PBS	foszfát puffer (phosphate buffered saline)
TAI	traumás axonkárosodás (traumatic axonal injury)
TBI	traumás agykárosodás (traumatic brain injury)
TNF	tumor nekrozis faktor
UC	ultrastrukturális kompakció (ultrastructural compaction)
VIP	Vazoaktív intestinális peptid (vasoactive intestinal peptide)

## 2. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR

### 2.1. A koponyasérülés epidemiológiája

A fejlett ipari társadalmakban a 35 év alatti aktív, munkaképes populációt érintő vezető halálok, megelőzve a különböző daganatos valamint szív és érrendszeri betegségeket, a koponyasérülés okozta agyi károsodás. Míg a nyugati társadalmakban a koponyasérülés következtében létrejövő halálozás 20-25%-ot tesz ki, addig ez Magyarországon eléri a 45%-ot [127]. Az Egyesült Államokban készített felmérő tanulmány szerint évente 100.000 ilyen jellegű sérülésből 180-250 eset végződik halállal [21]. Európában 1.600.000 koponyasérülést szenvedett beteg részesül kórházi ellátásban, ebből az agysérült páciensek aránya évente 100.000 emberből 235 fő, és 66.000 koponyasérült esete halállal végződik.

Koponyasérülések legfőképpen autóbalesetek, elesés, erőszakos behatások és különböző sportágakból fakadó sérülések okozataként jönnek létre. A leginkább veszélyeztetett demográfiai csoport a férfiak, és a hátrányos területeken-, illetve egyedül élők [21]. Sajnálatos módon nem csak az előbb említett rétegek veszélyeztetettek, hanem a gyerekek és a fiatal felnőttek is. Két éves kornál fiatalabb gyermekeknél leginkább maga a koponyasérülés okoz halált, gyakran az ún. „shaken baby szindróma” jön létre [30, 79].

A nagyban motorizált társadalmakban, így az Egyesült Államokban a koponyasérültek ellátásának közvetett és közvetlen költsége jelentős, utóbbiban az évi 60 milliárd USA dollárt is eléri [50]. A fejlett európai országokban a súlyos koponyasérültek kórházi ellátásának költsége páciensenként eléri a 6.000 Eurót [15], mely a teljes kezelési költségeknek csak egy kis hányadát teszi ki. Egy koponyasérült beteg élete végéig tartó kezelésének összköltsége az Egyesült Államokban elérheti a 200.000 USA dollárt is. Felmérések alapján 2020-ra a koponyasérülés globálisan a harmadik leggyakoribb vezető halálökká fog válni [99].

A National Institute of Health 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 egészségkárosodással [85].

## 2.2. A baleseti agysérülések osztályozása

A baleseti agysérüléseket többféle módon osztályozhatjuk. A sérülés súlyosságának meghatározására leggyakrabban használt módszer a Teasdale és mtsai. által kialakított Glasgow kóma skála (Glasgow Coma Scale, GCS) [149]. A pontrendszer három reakciót értékel ki: a szem kinyitását, a mozgást és a verbális megnyilvánulásokat. Az összesített értékek alapján megkülönböztetnek: enyhe (GCS=13-15), közepsúlyos (GCS=9-12), valamint súlyos (GCS=3-8) sérüléseket.

A koponyasérülések klasszikus felosztása szerint megkülönböztetünk nyílt (a dura mater sérül) és zárt sérüléseket (a dura mater intakt marad) [1]. A nyílt sérülések lehetnek penetráló, vagyis a koponyacsontot és az agyburkokat átszakító sérülések, valamint az agyvíz-tér és a külvilág indirekt közlekedését eredményező.

A sérülés patomechanizmusa alapján az irodalom megkülönböztet elsődleges és másodlagos elváltozásokat. Az elsődleges elváltozások a sérülés pillanatában a mechanikai erők hatására jönnek létre, amelyek érinthetik az ereket, axonokat, ideg-és gliasejteket fokális (gócos) vagy ép agyszövetben elszórtan (diffúz) előforduló módon. A két típus a sérültek nagy részénél egyidejűleg fordul elő. A másodlagos elváltozások a különböző típusú elsődleges elváltozásokhoz kapcsoltnak, az agy vér-, és oxigén ellátásának következményeként jönnek létre (1. ábra).

### **Agyi sérülést követő elsődleges elváltozások**

- I. Diffúz:       - axonális károsodás (diffuse axonal injury, DAI)  
                          axonduzzadás/axonballon-képződés  
                          ultrastrukturális (neurofilament) kompakció
- vaszkuláris károsodás (diffuse vascular injury, DVI)
- II. Fokális:     - intrakraniális vérzés  
                          - szubdurális vérzés  
                          - extradurális vérzés  
                          - szubarachnoidális vérzés  
                          - axonális károsodás  
                          - kontúzió  
                          - laceráció

### **Másodlagos elváltozások**

- I. Diffúz:       - hipoxiás-iszkémiás károsodás  
                          - agyduzzadás
- II. Fokális:     - hipoxiás-iszkémiás károsodás  
                          - agyduzzadás

**1.ábra:** Elsődleges és másodlagos agyi elváltozások osztályozása

### **2.3. Diffúz axonális károsodás**

A disszertáció első két fejezetének célterülete a DAI vizsgálata. DAI a koponyatrauma hatására létrejövő axonális elváltozások összessége, amelyek az ép axonok között elszórtan, többnyire ép parenchimális környezetben figyelhetőek meg. Olyan balesetek esetében jöhet létre, mint például motorbicikli, személygépkocsi, vagy gázolós balesetek, ahol acceleráció-deceleráció hatására ébredő nyíróerők játszanak főszerepet [127]. A komputer tomográfián (computer tomography, CT) az elváltozások kicsi, petekiális vérzések formájában, elsősorban a szürke- és a fehérállomány határán, valamint a *corpus callosum*-ban és a hosszú pályák agytörzsi szakaszán figyelhetőek



meg [32]. Annak ellenére, hogy a mágneses rezonanciás képalkotás (magnetic resonance imaging, MRI) megkönnyíti a kimutatást [14], a DAI teljes bizonyossággal csak szövettani vizsgálattal diagnosztizálható [64]. Gennarelli munkája alapján a DAI 50%-ban felelős a balesetek utáni tartós tudatzavarért illetve 35%-ban a mortalitásért a nem térfoglaló jellegű traumás agykárosodás (traumatic brain injury, TBI) esetekben [64].

A DAI-nak két morfológiailag jól elkülöníthető megjelenési formája ismert: az axonduzzadás/axonballon-képződés, valamint az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció. Korábbi elképzelés szerint mindkét megjelenési forma kiváltásában ugyanazok a tényezők játszanak szerepet és ugyanazokat az axonokat érintik. Újabb megfigyelések szerint a két elváltozás két jól elkülöníthető axon-populációban figyelhető meg [92, 140].

A DAI vizsgálathoz különböző állatkísérletes modelleket alkalmaznak. Mindazonáltal ezek nem képesek a humán viszonyokat, például a humán DAI teljes kiterjedését és időbeni lefolyását 100%-ban utánozni, ezért az állatkísérletekben modellezett axonkárosodást traumás axonkárosodásnak (traumatic axonal injury, TAI) nevezzük, a DAI elnevezést pedig a humán esetekre használjuk [102].

### **2.3.1. Axon duzzadás/axonballon képződés (AD/B)**

A diffúz axonkárosodás jelenségét, mint a súlyos traumás agysérülések következetes velejáróját Strich és munkatársai írták le először. Megfigyelték, hogy a súlyos koponya-agysérültek *post mortem* vizsgálata során a fehérállományban az ép axonok között elszórt ballszerű axontágulatok láthatóak, amely tágulatoktól disztális axon-szakaszon Waller-féle degeneráció és mielin-degradáció is megfigyelhető [142, 143]. Elméletük szerint a kórkép korai szakaszában a trauma által létrejött mechanikus erők vezetnek az axon szakadásához, az érintett proximális axonvég következményes retrakciójához valamint az axoplazma kiboltosulásához, létrehozván ezzel a „retrakciós axonballont”. A „retrakciós axonballon” után, a disztális axon-szakasz Waller-féle degenerációja jön létre [142]. Míg Strich a megfigyelt elváltozásokat, mint a „fehérállomány diffúz degenerációját” vagy „traumás idegrost szakadást” definiálta, addig a manapság használt elnevezés, -a diffúz axonális károsodás-, Adams-tól szárazik [3]. Strich óta Adams és kollégái hangsúlyozták először -szemben más kutatókkal-, hogy a kórkép kialakulásában az axonkárosodás a koponyasérülés elsődleges következménye, és nem pedig a másodlagos károsodás (ödéma, hipotenzio és/vagy

hipoxia) következtében alakul ki [68]. Adams és mtsai. megfigyelései alapján a DAI a féltekei fehérállományban, a *corpus callosum*-ban, az agytörzsi hosszúpályákban, illetve kisebb gyakorisággal a kisagyban fordul elő fokális károsodás nélkül (1-es fokozat). Fokális léziókkal pedig a *corpus callosum*-ban (2-es fokozat), illetve a rostralis agytörzsből (3-as fokozat).

Povlishock és munkatársai szerint ezen axonális károsodást a közepsúlyos illetve a súlyos koponyatrauma által kiváltott nyíróerők indítják el. Megállapították, hogy a DAI nem a trauma pillanatában azonnal és véglegesen kialakuló axonszakadásként alakul ki, hanem a károsodott axonok nagy részében egy időben fokozatosan előrehaladó folyamat [115]. Azóta ez az elmélet számos állatfajban és traumamodellben, valamint humán szövetmintákon is is beigazolódott [18, 20, 31, 32, 47, 64, 66].

A folyamat során a károsodott axonszakaszokban a sérülést követően gyakorlatilag azonnal (<5 perc) fokális axolemmális permeabilitási zavar jelentkezik („mechanoporáció”). Az axolemma fokális sérülését olyan morfológiai jellemzők kísérik, mint a mitokondriumok megduzzadása [95, 110, 111], neurotubulusok eltűnése [93, 111], neurofilament-módosulások [74, 105, 111, 117, 118] és az előre irányuló axonális transzportzavar [111, 116, 118, 138]. Ez utóbbi következményeként a szállító sejtalkotók és egyéb anyagok felhalmozódnak, így létrejön az axonduzzadás [94, 114, 115]. Az idő előrehaladtával az axonduzzadás egyre nagyobb mértékű lesz, melynek végeredményeként az érintett axonszakasz ballon formájában lefűződik, ezzel létrehozva a kórkép korai leírásaiból ismert proximális axonballonokat, míg a disztális axonszakasz Waller-féle degenerációt szenved [5, 96, 113, 117, 119]. Az axonális elváltozások kezdetétől, az axonballon kialakulásáig, valamint az axonszakadásig eltelt idő függ a trauma súlyosságától, módjától és az adott fajtól. Emberben ez az idő órákban és napokban mérhető, vagyis a kezelésre rendelkezésre álló terápiás ablak jóval hosszabb, mint a kísérleti állatok esetében. [130, 131, 156].

### **2.3.2. Az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (neurofilament compaction, NFC)**

Az NFC-t Povlishock és mtsai. fedezték fel koponyatrauma után szinte azonnal (5 perc) perfúziósan fixált állatok agytörzsének elektronmikroszkópos vizsgálatával [110]. Azt figyelték meg, hogy a neurofilamentek közötti távolságok mintegy felére csökkentek, valamint nagymértékben csökkent a mikrotubulusok illetve a neurofilament

oldalkarok száma. Elképzelésük szerint az NFC mechanizmusa a következő: koponyatrauma hatására az érintett axon egy rövid (átmérőjénél alig hosszabb) szakaszán makromolekulákat (pl. tormagyökér-peroxidáz) [110, 111] áteresztési képes méretű pórusok nyílnak meg (mechanoporáció). Ezáltal megszűnik az axolemmának az ionháztartást szabályozó szerepe; az axonba kalcium ionok áramolnak be. A nagymértékben megnövekedett kalcium koncentráció következtében aktiválódik a kalpain-nevű cisztein proteáz, amely a nem-erithroid alfa-II spektrint 145 kD és 150 kD méretű egységekre bontja (kalpain-mediálta spektrin proteolízis, CMSP), amelyek speciális immunhisztokémiai eljárással kimutathatóak [135]. A spektrin a szubaxolemmális citoszkeleton alkotórésze [12, 65, 109], amely az „ankyrin” fehérjén keresztül kapcsolódik a különböző membránfehérjékhez, valamint az axolemmához [38, 159], továbbá megtalálható a mitokondriumok körül is [41, 65]. A spektrin bontása eleinte csak a szubaxolemmális tér és a mitokondriumok körül zajlik (15-30 perc), majd továtévedik az érintett axon citoszkeletonális hálózatára [26], melynek emésztődése további permeabilitási zavart és további intraaxonális proteolitikus kaszkád aktiválódást eredményez, amely végül irreverzibilis axonkárosodást okoz [25, 26]. Az NFC kimutatására a közepes méretű neurofilament „M”-alegysége elleni RMO-14 antitestet találtak használhatónak, amely a neurofilament oldalkarok defoszforilálódása során szabaddá vált neurofilament-M alegység „rod domén”-jéhez képes kötődni [87, 117]. Kezdeti elképzelések szerint a citoszkeletonális elváltozások ugyanazokat az axonokat érintik, mint az axonduzzadás/ballonképződés; mégpedig: a neurofilament-kompakció következményeként áll le az előre-irányuló intra-axonális transzport, amely az axon-duzzadás/ballonképződés okozója. Erre abból következtettek, hogy az intra-axonális transzportzavart mutató APP-pozitív axonok, és a neurofilament-kompakciót mutató RMO-14-pozitív axonok ugyanazon anatómiai régiókban fordultak elő, és befolyásolásuk ugyanazon intervenciókkal volt lehetséges [23, 24, 81, 104, 106]. Újabb megfigyelések szerint az AD/B és a NFC az estek többségében két különböző axonpopulációt érint, és csak kis részben figyelhető meg ugyanazon károsodott axonon belül, azaz egymástól független jelenségekről van szó [92, 140].

A neurofilament-kompakció mechanizmusának új alapra való helyezését az a megfigyelés tette szükségessé, hogy koponya-trauma után azonnal perfúziósan-fixált állatok agyában, sőt *post mortem* végzett koponyatraumát „szenvedett” állatok agyában is megtalálható volt egy speciális ezüstöző eljárással. Elektron-mikroszkópiás vizsgálat igazolta, hogy „sötét” idegsejtek képződnek koponyatrauma hatására az enzimatis

folyamatok számára szélsőségesen kedvezőtlen körülmények között is [58]. Ebben az esetben a kompaktálódott axonokban a mikrotubulusok épek látszóttak, a neurofilament oldalkarok sem tűntek el, csak megrövidültek. Ez arra utal, hogy a koponyatrauma utáni első órákban kísérletesen talált „kalcium-indukált, kalpain-mediált spektrin proteolízis” nem okozója, hanem következménye az ultrastrukturális kompakciónak. Minthogy a kompakció nemcsak a neurofilamenteket érinti, hanem az axon valamennyi ultrastrukturális elemét, célszerű a neurofilament kompakció helyett az ultrastrukturális kompakció terminus technikust alkalmazni. Az ezüstöző eljárással kimutatható volt, hogy az ultrastrukturális kompakció az axon viszonylag hosszú (akár 1 mm-nél is hosszabb) szakaszát érinti, de - disztális irányban - általában nem a teljes hosszúságát, és - proximális irányban - általában nem éri el az axon eredési dombot.

Egy speciális koponyatrauma módszer segítségével ultrastrukturális axon-kompakciót sikerült előidézni egyébként ép agykéreg előre kiválasztott területén [107]. Ezen módszer alkalmazásával kiderült, hogy a kompaktálódott axonoknak csupán egy hányada degenerálódik, másik hányaduk néhány óra leforgása alatt visszanyeri eredeti struktúráját [61]. Az axonokban végbemenő ultrastrukturális kompakció feltételezett mechanizmusa megegyezik az idegsejtek szómájában és dendritjeiben végbemenő (és a következő alfejezetben tárgyalt) ultrastrukturális kompakciójával, ezért ott tárgyaljuk.

#### **2.4. Diffúz idegsejt-károsodás („sötét” idegsejt képződés)**

Több mint száz éve írták le [52], hogy különböző neurológiai betegségekben meghaltak agyában olyan idegsejtek találhatóak, amelyek magja, citoplazmája és a fő dendritjei nagymértékben zsugorodottak, valamint erősen kötik a neurohisztológiában használatos bázikus festékeket (hiperbazofília). Ezért ezeket a sejteket tradicionálisan „sötét” idegsejteknek nevezik [28]. A 80-as éve eleje óta számos neurológiai megbetegedés állatkísérletes modellje esetében is leírták a „sötét” idegsejtek jelenlétét. A hipoglikémia és a hiperglikémia hatására képződött „sötét” idegsejtekről kimutatták, hogy mind elpusztulni, mind pedig regenerálódni képesek [4, 10]. Status epilepticus esetében ugyanez a helyzet [9, 136]. Fokális iszkémia utáni reperfúzió esetében pedig az iszkémiás góc széli területein lehet megfigyelni ezen elváltozást [36, 72, 76, 80, 101, 134, 134]. Négy-ér iszkémia esetében a reperfúzió után főleg a *hilus* és a *hippocampus* CA1 régiójában, valamint a *cortex* területén figyelhető meg elszórt „sötét” állapotban keresztüli sejtpusztulás [36, 72, 80]. Gallyas és mtsai. a 90-es évek elején megfigyelték,

hogy mind *in vivo*, mind pedig *post mortem* mechanikai trauma hatására is képződnek „sötét” idegsejtek és axonok [62].

Elektronmikroszkópos vizsgálatok [58] szerint a „frissen” képződött „sötét” idegsejtek ultrastrukturális elemei épnek tűnnek, de szorosan egymás mellé tömörülnek (ultrastrukturális kompakció). Az érintett sejtek elektron-denzitása megemelkedik, térfogata pedig mintegy felére csökken a plazma-membrán felszakadása nélkül. Az endoplazmatikus retikulum (ER) ciszternái összeszűkülnek, a Golgi-ciszternák viszont kitágulnak. Nem változik a mitokondriumok és a multivezikuláris testek térfogata. Az érintett idegsejtek egy hányada néhány óra alatt visszanyeri eredeti morfológiáját (recovery), egy másik hányada viszont elpusztul. Azon az alapon, hogy a „frissen” ultrastrukturális kompakciót szenvedett idegsejtek és a „frissen” ultrastrukturális kompakciót szenvedett axonok fény- és elektron-mikroszkópos sajátosságai azonosak, képződési mechanizmusukat is azonosnak tartják [58].

A „sötét” idegsejtekre jellemző, hogy ha szómája kompaktálódik, akkor dendritfája is, és fordítva. Az axonoknak mindig viszonylag hosszú szakaszai kompaktálódnak. E jelenségek csak úgy magyarázhatóak, hogy a kompaktálódás minden egyes szóma-dendrit domén, vagy axon egyetlen pontján indul meg, majd onnan terjed rá az egészre. Ezt a folyamatot úgy magyarázzák [55, 58] úgy magyarázták, hogy az idegsejtek (és más sejtek) citoplazmájában egy - az ultrastrukturális elemekhez „lehorgonyzott” - mikro-trabekuláris gél-struktúra található, amely nem-kovalens kötések formájában energiát tárol, és amely képes - egy ponton való iniciálás után - összehúzódással járó, tovaterjedő fázisátalakulásra (gélből-gél fázisátalakulás) a tárolt energia hatására. A gélből-gél fázisátalakulás a polimer-kémiában ismert jelenség [6, 148]. Az erre képes géleknek két, vagy több metastabil állapota van és a különböző energiaszintű metastabil állapotokhoz eltérő polimer-molekula konformáció, eltérő víztartalom és egymástól eltérő térfogat tartozik. Megfelelő aktivációs energia közlésével a magasabb energiájú metastabil struktúra egy pontja „átbillen” az alacsonyabb energiaértékű, ám ugyanakkor energetikailag stabilabb állapotba. Az itt felszabaduló energia a szomszédos pontokon aktivációs energiaként szolgálva láncreakciót indít el (dominó-elv). A „sötét” idegsejtek esetében a fázisátalakulás iniciálódhat patometabolikus folyamat (iszkémia, hipoglikémia, epilepsziás roham vagy mechanikai behatás) által. A gél-struktúra összehúzódása magával vonja a hozzá horgonyzott ultrastrukturális elemeket, és folyadékot présel ki a szóma-dendrit doménból illetve az érintett axon-szakaszokból [58].

## 2.5. Sejthalál mechanizmusok agysérülésben

Koponyasérülés során az elsődleges károsodás mellett másodlagos folyamatok is elindulnak. A különböző állatkísérletes modellekben az erőbehatás nagyságától, nemtől, életkortól, sejttípustól és agyi régiótól függően különböző sejthalál-mechanizmusok aktiválódnak. Az elmúlt évtizedben egyre több, a sztrók, a neurodegeneratív betegségek, valamint a neurotrauma területén született kutatási eredmény kérdőjelezi meg a jelenleg is érvényben lévő „nekrózis- apoptózis” paradigma helyességét [67].

A klasszikus leírás alapján a nekrosis a sejthártya integritásának megszűnésével, duzzadással, végül a sejtorganellumok szétesésével járó folyamat.

Az apoptózis a klasszikus definíció szerint a filogenezis során konzervált, fiziológias folyamat, amelynek szerepe a szöveti homeosztázis fenntartása. Jellegzetessége a kromatin-kondenzáció, mag-fragmentáció, a sejtsugorodás, végül az apoptotikus testek képződése, amelyeket makrofágok takarítanak el. Mivel az apoptózis, szemben a nekrozissal energia igényes folyamat, ezért az apoptózis elsősorban az iszkémiás vagy traumás sérülés nekrotikus központja körül elhelyezkedő széli (penumbra) területen fordul elő. Kulcsenzime a kaspáz, amely mitokondriális károsodás valamint halálreceptorok segítségével aktiválódhat. Az apoptózisnak ismert kaspáztól független formája is, amelyben különböző faktorok – mint az az AIF vagy endonukleáz G (mitochondriális nukleáz) – mediálják a típusos programozott sejthalál fenotípus megjelenését [151, 157].

Egyes kutatási eredmények alapján a sejtet ért behatás erősségétől (mechanikai energia), a kalcium-felszabadulás mértékétől, illetve az intracelluláris ATP-szinttől függ [44], hogy a sejt melyik sejthalál utat választja. Feltételezik, hogy az egyik út gátlása a másik irányába tereli a sejtpusztulást [19, 51, 112]. Mind a nekrosis, mind az apoptózis csak abból a genetikailag előre meghatározott eszközkészletből válogathat, amelyből a fiziológias működések is, így az élettani és a különböző noxák által elindított patológias folyamatok a genotípusukban és ez által a fenotípusukban is hasonlíthatnak egymáshoz.

Egyes szerzők szerint a nekrosis és az apoptózis egy képzeletbeli spektrum két szélén helyezkedik el, amely között bármilyen „hibrid” előfordulhat [157]. Más kutatók nekrosis, „nekrózis-szerű”, „apoptózis-szerű”, és apoptózis kategóriákat használnak [88]. Mindezek alapján ugyan különböző sejthalál-típusokról beszélünk, de ezek viszont gyakran ugyanazokat a jelátviteli utakat használják [54].

Az elpusztult „sötét” idegsejtek vagy az apoptotikushoz hasonlóan (a kompaktálódott struktúra homogenizálódik, majd membránnal körülvett fragmentumokra bomlik, amelyeket fagocitáló sejtek kebeleznek be), vagy pedig a nekrotikushoz hasonlóan (a kompaktálódott ultrastruktúra fellazul, majd elemei „szétzilálódnak”, végezetül előbb a plazma-membrán, majd a mag-membrán eltűnik) „takarítódik” el a szövetből [56]. Ismeretes, hogy az apoptotikus sejtek citoplazmája a biokémiai folyamatok lejátszódása és a mag-kromatin kondenzálódása után ultrastrukturális kompaktációt szenved. Azon az alapon, hogy a kompaktációt szenvedett apoptotikus sejtek fény- és elektron-mikroszkópos sajátosságai megegyeznek a „sötét” idegsejtekével feltételezik [55], hogy az ultrastrukturális kompaktáció mechanizmusa mindkettőben ugyanaz. Így a „sötét” idegsejt képződés nem más, mint a fiziológiás apoptózis számára genetikailag kódolt ultrastrukturális kompaktáció nem-apoptotikus (nem-kódol, téves) indítása.

Az ultratrstrukturális kompaktációt szenvedett apoptotikus sejtek is „eltakaríthatódnak” a nekrotikushoz hasonló úton [55]. Ezért el kell választani a sejt-halál folyamatát a meghalt sejtek „eltakarításának” folyamatától. Az előbbi lehet nekrotikus, apoptotikus, egyéb [67], vagy a „sötét”-idegsejt állapoton keresztüli; az utóbbi pedig apoptotikushoz-hasonló, vagy nekrotikushoz-hasonló [55].

## **2.6. A diffúz axonális károsodás terápiás befolyásolását célzó vizsgálatok**

Az előző fejezetekből kitűnik, hogy az axon-duzzadás/ballonképződés egy órák alatt kialakuló folyamat eredménye, az ultrastrukturális kompaktációt szenvedett axonok pedig regenerációra képesek, a DAI mindkét formájában lehetőség nyílik a károsodás mérséklésére.

Mivel a dolgozat az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) és egy poli (ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) inhibitor, az L-2286 terápiás hatásával foglalkozik, így e bevezető részletesen csak a PACAP és a PARP inhibitorok hatásmechanizmusát tárgyalja.

### **2.6.1. Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polipeptid**

A PACAP szerkezetileg a vazoaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/glükagon családba tartozik, melyet elsőként a *hipotalamusz*-ból izoláltak [98]. A fehérje a *hipofízis*-ben növeli az adenilát-cikláz aktivitást, neuromodulációs funkciója mellett a központi-, illetve a perifériás idegrendszer területén neurotrófikus és neuroprotektív hatást fejt ki [7]. Antiapoptotikus hatását igazolta, hogy a gerincvelő sérülés „extradural

static weight compression” modelljében a szignifikánsan csökkentette a gerincvelői apoptózist [77], továbbá gerincvelő átmetszés modelljében kivédte a tumor nekrozis faktor (TNF) felszabadulást [78]. *In vitro* mind antiapoptotikus, mind gyulladáscsökkentő hatásait leírták. A kisagy granuláris sejtjeiben szignifikánsan gátolta a kaszpáz-3 aktiválódást [153], mikroglialis pro-inflammatorikus citokin és nitrogén-oxid felszabadulást [40, 78, 84], illetve serkentette az anti-inflammatorikus IL-10 citokin termelődését [63]. A PACAP több olyan gén működését indítja be, amelyek a neurotoxicitás elleni védekezésben szerepet játszanak, ilyen például a citokróm P450 és az fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor, FGF) [152].

A PACAP kísérletes körülmények között gátolta a mitokondriális kalcium felvétel hatására létrejövő akonitáz enzim inaktiválódást, ezzel megtartva ennek a neuronok működőképességéhez nélkülözhetetlen enzimnek a funkcióját [145].

*In vivo* vizsgálatok szerint a PACAP átjut a vér-agy gáton [13]. A PACAP hatásosnak bizonyult patkányon kísérletesen előidézett globális és fokális agyi iszkémia előtt, valamint után adva, továbbá retina-degeneráció esetében is [8, 11]. Viselkedés-vizsgálatok alapján kimutatták, hogy Huntington-kór állatkísérleti modellje esetében a PACAP-al előkezelt patkányokban hiperkinézia nem alakult ki, és az aszimmetrikus mozgás is megszűnt a kezelés utáni 10. napon [146]. A Parkinson-kór állatkísérletes modelljében a PACAP-al történő előkezelés csökkentette a hipokinézia súlyosságát, valamint teljes felgyógyuláshoz és az aszimmetrikus jelek megszűnéséhez vezetett a kezelés utáni 10. napon [123].

### **2.6.2. A poli (ADP-ribóz)-polimeráz gátlása**

A PARP egy kromoszómális enzim, amely olyan folyamatok működésében vesz részt, mint a DNS javítás [37], és a programozott sejthalálnak, az apoptózisnak a létrejötté. Oxidatív stressz hatására kialakuló DNS törés következtében aktiválódik, melynek eredményeként a nikotinamid adenin-dinukleotidról ( $\text{NAD}^+$ ) ADP-ribóz egységeket transzferál nukleáris fehérjékre. Ez a rendkívül energia igényes folyamat, halmozott stressz hatására kialakuló túlműködésével a  $\text{NAD}^+$  deplécióját, ATP vesztést és a sejt energia-homeosztázisának összeomlása révén nekrotikus úton bekövetkező sejthalálhoz vezet [27]. Miközben a PARP hosszú távú gátlása elvileg mutagenezist és karcinogenezist indukálhat, az akut szakban hozzájárulhat az energia-háztartás rendeződéséhez és az energia-homeosztázis fenntartásához.



A PARP központi szerepet játszik a kaszpáztól-független, apoptózis-indukáló faktor (apoptosis-inducing factor, AIF) közvetítette apoptózis létrejöttében, valamint az NF-kappaB-úton keresztül gyulladáshoz vezető citokinek és mediátorok felszabadulását is befolyásolja [83].

Az elmúlt évek során fény derült arra, hogy a PARP aktiválódása szerepet játszhat a kaszpáz-független apoptózis létrejöttében [43, 158], ezért a PARP gátlók fontos terápiás lehetőségnek számítanak a koponyasérülés okozta agyi károsodás során létrejövő nekrozis, illetve apoptózis létrejöttének csökkentésében [128].

Korábbi vizsgálatok többféle PARP gátlók, mint például benzamid analóg vegyületek (3-aminobenzamid) és az isoquinolin származékok hatását vizsgálták koponyasérülés okozta agyi károsodás esetében [16, 17, 86, 128]. A különböző állatkísérletes modelleken végzett sikeres kísérletek eredményeinek alapján reményeink szerint a PARP gátló vegyületek is fontos szerepet játszhatnak a későbbi klinikai kezeléseknél során.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Amint a Bevezetésben található táblázatból kitűnik, a koponya-trauma hatása rendkívül összetett, komplex folyamatainak követése még *in vitro* modellkísérletekn, vagy egyszerű állatkísérletes, rágsáló modellen sem könnyű. Éppen ezért a koponyatrauma patológiás hatásának egyes részleteire próbáltunk fókuszálni a jelen disszertáció alapját képező vizsgálatokban, mely kérdéseket a rendelkezésünkre álló módszerek hasonlósága is összekapcsolja. Minthogy a másodlagos koponyatraumás elváltozások közé tartozó iszkémiás károsodás előfordulása és lokalizációja rapszodikus, ráadásul tovább bonyolítja a fenti képet, az iszkémiát egy jól reprodukálható nem-koponyatraumás modellben vizsgáltuk.

A munka során feltett alapvető kérdések az alábbiak voltak:

Van-e neuroprotektív hatása a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidnek (PACAP-nak) a centrális folyadék-perkussziós (CFP) patkány-moddell végzett traumás agysérülés esetén?

Van-e neuroprotektív hatása az L-2286-nak (egy új fejlesztésű PARP-inhibitornak) a Marmarou-féle impakt accelerációs patkány-moddell végzett traumás agysérülés esetében?

Mi a sorsa a tranziens fokális agyi iszkémia okozta „sötét” (ultrastruktuális kompakciót szenvedett) idegsejteknek nem-nekrotikus és nem-excitotoxikus szöveti környezetben?

#### **4. AZ AGYALAPI MIRIGY ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) NEUROPRTEKTÍV HATÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA A CENTRÁLIS FOLYADÉK-PERKUSSZIÓS (CFP) PATKÁNY-MODELLEL VÉGZETT AGYSÉRÜLÉS ESETÉBEN**

A fejezet alapjául szolgáló publikáció:

**Kövesdi, E.;** Tamás, A.; Reglődi, D.; Farkas, O.; Pál, J.; Bukovics, P.; Dóczi, T.; Büki, A.: Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats. *Neurotox. Res.* 2008, 13:71-8

## 4.1. Bevezetés

A PACAP szerkezetileg a szekretin/glükagon/vazoaktív intestinális peptid családba tartozik. Elsőként birka *hipotalamusz*-ból izolálták adenilát-cikláz aktiváló hatása alapján [98]. Több tanulmány szerint számos *in vivo* és *in vitro* neuroprotektív hatása ismert [7, 137, 154]. Sajnálatos módon az *in vivo* neuroprotektív hatás pontos mechanizmusa nem tisztázott még pontosan. Az *in vivo* tanulmányok a PACAP apoptózis és gyulladás gátló hatását bizonyítják. Agyi granuláris sejtekben szignifikánsan képes gátolni a kaszpáz-3 aktivitását [154], valamint hatást gyakorol a mitokondriális átjárhatóságra, ugyanis gátolja az akonitáz enzim mitokondriális kalcium-felvétel indukálta inaktiválódását. Az akonitáz egy kulcsfontosságú mitokondriális enzim, amely befolyásolja az idegsejtek életképességét [145].

Korábbi kutatások alapján a PACAP hatásosnak bizonyult patkány kísérletes globális és fokális agyi iszkémia esetében sérülés előtti, illetve utáni kezelések esetében [124, 125, 150], Parkinson-kórban és retinális degeneráció esetében is [11, 121, 123, 150].

Az utóbbi néhány évig csak kevés tanulmány foglalkozott a PACAP esetleges neuroprotektív tulajdonságának vizsgálatával trauma okozta agy, illetve gerincvelői sérülés esetében. A gerincvelői károsodást okozó „extradural static weight compression” modelljében szignifikánsan csökkentette az apoptotikus sejtek számát a sérült gerincvelőben [77].

Az elmúlt években pécsi kutatók vizsgálták a PACAP neuroprotektív hatását diffúz károsodást okozó trauma modellben patkányon [49, 147]. A korábban agyi iszkémiában hatásos dózis (125 µg, sérülés előtti intavénás kezelés) nem volt hatásos, ám az intracerebroventrikuláris (i.c.v.) kezelés hatásosnak bizonyult [49].

A vizsgálatunkban használt dózis a fenti munkacsoport kutatási eredményein alapul, miszerint az i.c.v. 100 µg PACAP képes szignifikánsan csökkenteni a károsodott axonok denzitását a kortikospinális pálya (corticospinal tract, CSpT) területén.

## 4.2. Anyagok és módszerek

### 4.2.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket 350-380 g-os hím Wistar patkányokon végeztük, amelyeket a Pécsi Idegsebészeti Klinika kutatólaboratóriumának állatházában standard körülmények között tartottuk, étellel és vízzel *ad libitum* ellátva. Az állatok tartását és kezelését az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak

megfelelően végeztük. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága (engedélyszám: BA 02/2000-26/2001) engedélyezte.

#### **4.2.2. A centrális folyadék perkussziós modell kivitelezése patkányon**

Összesen 21 felnőtt Wistar patkányt (350-380g) használtunk a vizsgálatokhoz. Ebből 18 állat részesült az előre meghatározott műtéti protokoll [42, 97] alapján középsúlyos (2 atm) CFP okozta koponyasérülésben, míg 5 állaton csak magát a műtétet végeztük el, de traumát nem kaptak (ál-műtött csoport).

A műtéti eljárás során az állatokat 5 percig előaltattuk 4% isoflurán (Abbot Laboratories (Magyarország) Kft.), 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> keverékével. Intubálás után a műtét alatt a patkányokat mélyen altattuk 1-2% isoflurán, 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> elegyével, altatógép segítségével (Inspira ASV, Harvard Apparatus USA). Az állatok testhőmérsékletét minden műtét alatt állandóan mértük és 37 °C-on tartottuk egy speciális fűtőpad segítségével (FHC BOWDOINHAM ME 04008 USA Temperature Control). Az artériás oxigén szaturációt az egyik hátsó végtagon elhelyezett pulzusoximéter (NONIN 8600 V) segítségével folyamatosan ellenőriztük egészen az állatok ébredéséig a műtétek után. Intubálás után az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a fejtető bőrén ejtett hosszanti bemetszéssel feltártuk a koponya Lambda és Bregma varratok közötti részét. Két 1 mm-es lyukat fűrtünk a koponya jobb oldali frontális és occipitalis részébe 1 mm-re a Bregma és Lambda varratoktól, majd ezekbe a “korona” jobb rögzítése céljából kisméretű csavarokat rögzítettünk; 4,8 mm átmérőjű koponyaléket fűrtünk a Lambda és Bregma varratok közötti középvonalon a durát sértetlenül hagyva. A “korona” fő részeként a lyuk felett műanyagból készült úgynevezett sapkát rögzítettünk, majd fogászati akrill segítségével a két korábban már rögzített csavarokat és a sapka körüli területeken a sapka magasságával megegyező szintig kialakítottuk a “koronát”. Az akrill megszáradása után a sapkát fiziológiás sóoldattal töltöttük fel. A kísérlet állatokat közvetlenül a trauma képzése előtt levettük az altatógépről, majd az állatokat a FP berendezésre felhelyezve középsúlyos (2 atm) koponyatraumában részesültek. A trauma után az állatok a spontán légzés visszatéréséig megfigyelés alatt álltak, s ha 20 mp alatt nem tért vissza a spontán légzés, akkor lélegeztető gépre kerültek, ahol 100% O<sub>2</sub>-t kaptak a légzés normalizálódásáig. A műtét végén az állatok fejbőrét összevarrtuk, és egyesével visszahelyeztük a saját ketrecükbe.

#### 4.2.3. I.c.v. PACAP kezelés

A hatóanyag kezelt csoportban esetében (n=8) 30 perccel a trauma után folyamatos altatás alatt a Bregmát 0:0 koordinátájú pontnak tekintve (Paxinos és Watson, 1997) az AP:-1,0; L: 1,5; V:-3,5; agyterület felett fogászati fúró segítségével, mikroszkópos kontroll alatt megnyitottuk a koponyát, és i.c.v. kezeléssel 100 µg PACAP-ot 5µl fiziológiás sóoldatban feloldva juttattunk be a jobb oldali agykamrába. Míg a vehikulum kezelt csoport (n=8) esetében ezzel megegyező módon fiziológiás sóoldatot kapott.

#### 4.2.4. Immunhisztokémia

Trauma után két órával az állatokat intraperitoniális pentobarbituráttal túlaltattuk. Ezt követően szíven keresztül előbb fiziológiás sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk őket. Az agyakat a gerincvelő agytörzsi szakaszával együtt eltávolítottuk a fixált állatokból és egy éjszakán keresztül fixáló oldatban tároltuk (4%-os paraformaldehid). Az agytörzsi részből egy mediális 5mm széles blokkot vágunk ki speciális agyfeldarabolódást segítő eszközzel (Braintree Scientific Inc.), majd vibratóm segítségével 30 µm-es szeletekre vágtuk. Ezeket 0,1 M-os foszfát pufferben tároltuk az immunhisztokémiai protokoll elvégzésének megkezdéséig. Az így előkészített metszeteket két részre osztottuk a kétféle immunhisztokémiai vizsgálatához.

A károsodott axonális transzport vizsgálatához béta-amiloid prekursor protein C-terminusára (APP) ható poliklonális antitesttel immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. Az APP a gyors axonális transzporttal szállítódik. A koponyatrauma okozta agysérülés következtében létrejövő axonális károsodás során az axoplazmatikus transzport károsodik és az APP felhalmozódik a károsodás helyén [22, 23, 26, 74, 92, 117, 118]. Az RMO-14 antitest a trauma következtében konformáció váltazáson átesett neurofilamentumok "M" alegységén található "rod-domén"-hez kötődve a citoskeleton károsodásának (NFC) kimutatására alkalmas [23, 87, 105, 117].

Az agyszeleteken 30 percig 0,5 %-os hidrogén-peroxidal történő endogén peroxidáz blokkolása után a szeletek 3x10 percig történő foszfát pufferes (phosphate buffered saline, PBS) mosása következett. Ezután Stone leírása alapján [141] citrát-pufferben antigén-feltárás következett. Újbóli 3x10 percig tartó PBS-es mosás után a háttérgátlás miatt a metszeteket PBS és a Vectastain ABC standard "Elite" kit (Vector) 1%-os lószérumában inkubáltuk 35 percig. Ezután a primer antitesttel történő kezelés

következett, ami APP jelölés esetében nyúl-anti-APP és lószérum keverékét (1:500), míg RMO-14 jelölés esetében egér monoklonális RMO-14 antitest és lószérum keverékét (1:500) jelenti egy éjszakán át történő inkubálással. Másnap 3x10 percre tartó PBS-es mosás után a szekunder antitestel 1 órán át tartó inkubálás következett. Újbóli 3x10 perces PBS ben történő mosás és avidin biotin-peroxidáz komplexel történő inkubálás után a szeleteket 3x10 percre tartó PBS-ben mostuk. Ezután az immunhisztokémiai komplexet a láthatóvá tétel miatt 0,05%-os diamino-benzidin (DAB) és 0,01%-os hidrogén peroxid oldattal előhívtuk. A DAB-al történő előhívás után a metszeteket még 1x10 percre tartó PBS-ben mostuk, majd a metszetek desztillált vízből való tárgylemezre felhúzója és 30 percre tartó száradása után lefedtük a fénymikroszkópos vizsgálathoz.

#### A szövettani vizsgálatok elemzése Image-Pro Plus v5.0.1 segítségével

Az APP illetve RMO-14 immunopozitív axonokat fénymikroszkóp (Nikon), hozzákapcsolt digitális fényképezőgép (Spot Rt), valamint számítógépes képvizsgáló programmal (Image-Pro Plus v5.0.1) elemeztük. A korábbi leírások alapján a DAI legfőképpen érintett területe a CSpT és a mediális hosszanti köteg (medial longitudinal fascicle, MLF) agytörzsi szakasza, ezért ezeket a területeket elemeztük az immunhisztokémiai protokoll elvégzése után. Állatonként 6 agytörzsi szakasról készítettünk digitális képet 20-szoros nagyításban. 45.000  $\mu\text{m}^2$ -es területen mind a CSpT, mind az MLF területén a károsodott axonokat összeszámoltuk.

#### Statisztikai analízis

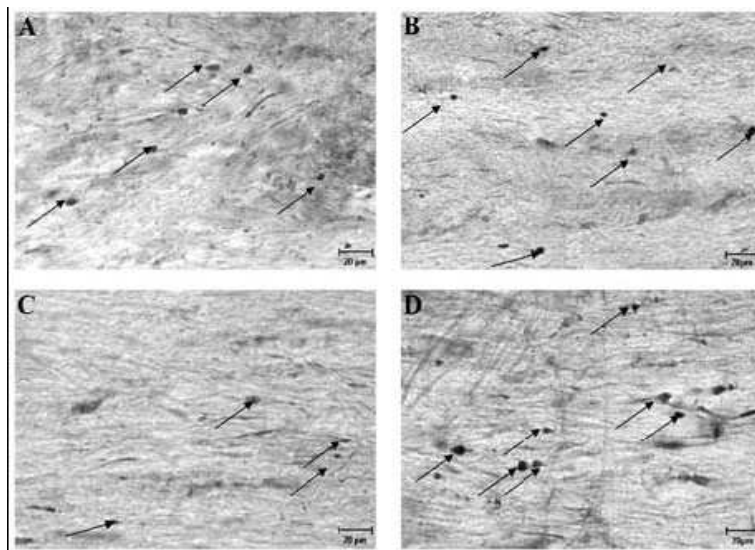
A PACAP és a vehikulummal kezelt csoport közötti károsodott axonok denzitásbeli (átlag/ $\text{mm}^2$ ) különbségét Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

### **4.3. Eredmények**

Az ál-műtött állatok immunhisztokémiai vizsgálatnak fénymikroszkópos elemzése károsodott axonokat nem mutatott ki. Az APP immunopozitív axonok morfológiai képe megduzzadt, részben szétszakadt axondarabokat mutatott. Az RMO-14 immunopozitív axonok lobuláltak és részben vagy teljes mértékben szétszakadtak a fénymikroszkópos képen. Ezek a megfigyelések megegyeznek a más kutatók által korábban már hasonló túlélési időt követően leírt károsodott axon-alakokkal [22, 24,

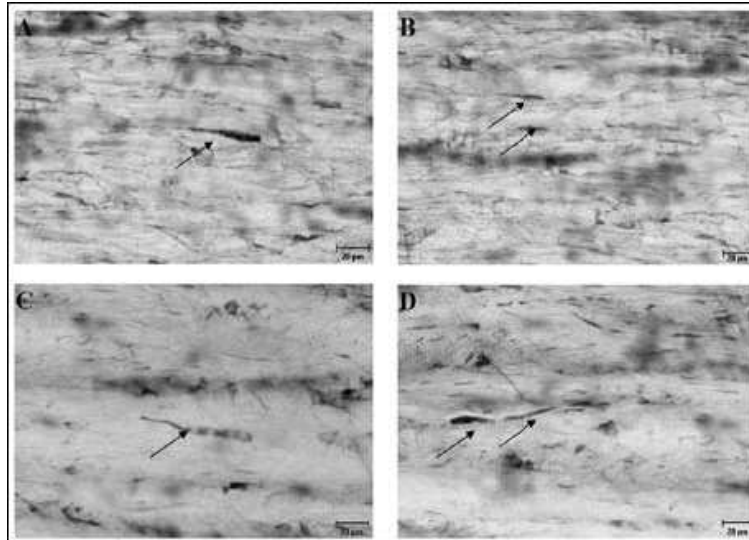
139]. Sem az APP, sem az RMO-14 immunoreaktív axonok morfológiai jellege nem különbözött a PACAP-, illetve a vehikulum kezelt csoportban.

Az eredmények fénymikroszkópos valamint statisztikai elemzése során megállapítottuk, hogy a közepsúlyos CFP okozta koponyatrauma után 30 perccel történő i.c.v. PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette mind az APP, mind az RMO-14-immunopozitív axonok denzitását a CSpT-ben a vehikulummal kezelt állatokhoz viszonyítva. Ezzel szemben az MLF-ben szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk sem az APP, sem az RMO-14-immunopozitív axonok denzitásában a PACAP és vehikulummal kezelt csoport között (2-5. ábra).

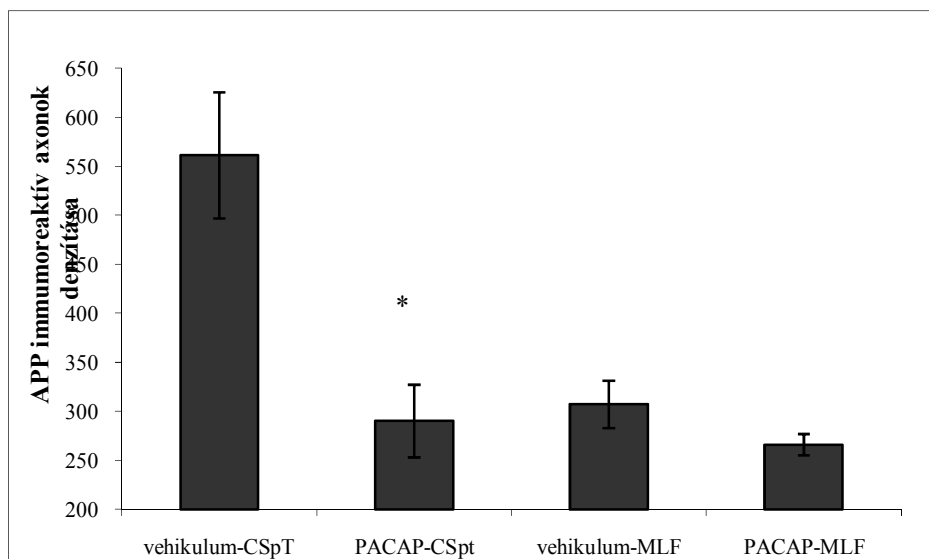


**2. ábra:** Megduzzadt, részben szétszakadt APP immunopozitív axonok fénymikroszkópos képe a kortikospinális pályában (CSpT, A és B) és a mediális longitudinális köteggben (MLF, C és D) a PACAP (A és C) illetve vehikulummal kezelt (B és D) állatok esetében.

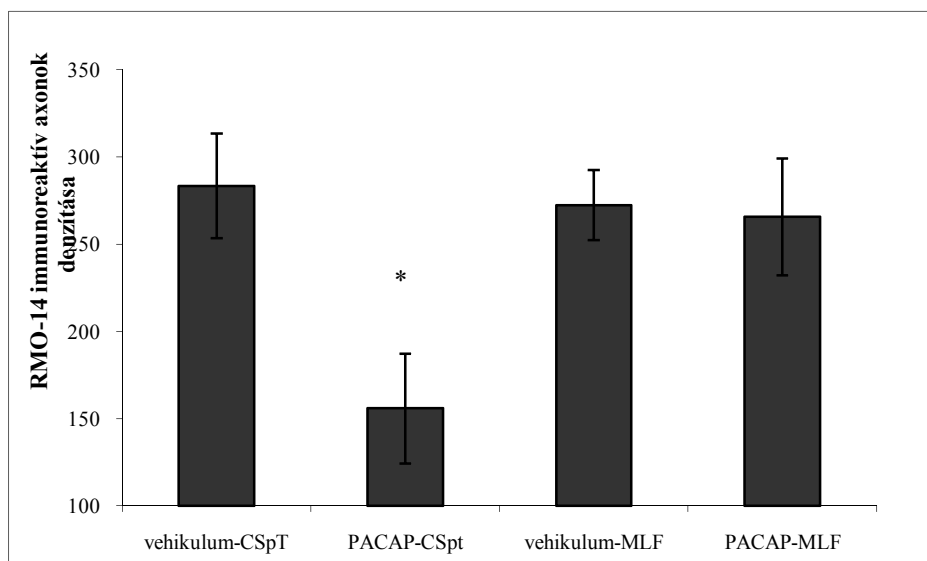




**3.ábra:** Lobulált, részben vagy teljes mértékben szétszakadt RMO-14 immunopozitív axonok a kortikospinális pályában (CSpT, A és B) és a mediális longitudinális kötegben (MLF, C és D) a PACAP (A és C) illetve vehikulummal kezelet (B és D) állatok esetében.



**4. ábra:** APP immunopozitív axonok átlagos denzitása CSpT és a MLF területén a PACAP és vehikulummal kezelet állatok esetében. Az adatok  $\text{átlag/mm}^2 \pm \text{SEM}$ -ben kifejezve (\* $p < 0,05$  a vehikulum kezelt csoportéhoz viszonyítva).



**5. ábra:** RMO-14 immunopozitív axonok átlagos denzitása a CSpT és az MLF területén a PACAP és vehikulummal kezelt állatok esetében. Az adatok átlag/mm<sup>2</sup> ± SEM-ben kifejezve (\*p< 0,05 a vehikulum kezelt csoporthoz viszonyítva).

#### 4.4. Megbeszélés, következtetések

Munkánk az első olyan tanulmány, amely a CFP modellben bizonyította a PACAP neuroprotektív hatását DAI esetében. Eredményeink jól mutatták, hogy a közepsúlyos CFP modell okozta sérülés után 30 perccel történő i.c.v. 100 µg PACAP kezelés szignifikánsan képes volt csökkenteni a károsodott axonok denzitását a CSpT-ben. Megfigyeléseink alátámasztják azokat a korábbi tapasztalatokat [137], melyek szerint a diffúz TAI impakt accelerációs modellje esetében, a PACAP hatékony gátlószerként működik az axonális károsodás következtében létrejövő intraaxonális transzportzavar és NFC kivédésében.

Megfigyeléseink ezen kívül jól egybevágnak azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyek a PACAP neuroprotektív hatását vizsgálták különböző *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok során. E szerint *in vitro* körülmények között a különböző sejtvonalakon végzett kísérletek során hatékony apoptózist gátló hatással rendelkezik [132, 137], *in vivo* mind az átmeneti (tranzien), mind a tartós (permanens) fokális iszkémia állatkísérletes modellek esetében csökkenti az elhalt agyterület nagyságát [125, 137]. Teljes agyi iszkémia esetében az i.c.v. vagy intravénás PACAP kezelés gátolja az iszkémia okozta sejtpusztulást a *hippokampusz* CA1 régiójának területén [133]. A Parkinson-kór állatkísérletes modelljében a *substantia nigra* dopamintermelő

sejtcsoportjait megvédi a programozott sejthaláltól (apoptózis), valamint ezzel együtt javítja funkcionális kimenetelt [122, 123].

Habár azok a folyamatok, melyekben a PACAP *in vivo* neuroprotektív tulajdonsága érvényesül egyelőre még nem tisztázottak, az *in vitro* tanulmányok szerint a PACAP mind apoptózis-, mind gyulladásgátló hatással rendelkezik. TAI esetében a PACAP szignifikánsan gátolja a kaspáz aktivitást valamint az apoptotikus kaskád létrejöttében kulcsfontosságú szerepet játszó molekulák működését [25, 48]. Ez a hatás szintén megfigyelhető idegsejtkultúrákban és *in vivo* retina-sejttenyészetben is [120, 137]. A TAI létrejöttében fontos szerepet játszik az intraaxonális mitokondriumok integritásának megváltozása [24, 25, 106]. A kóros mitokondriális kalcium akkumuláció inaktiválja az akonitáz enzim működését, amely a fő mitokondriális enzim és befolyásolja az idegsejtek életképességét. A PACAP ezt az inaktivációt gátolva képes befolyásolni ezt a megváltozott mitokondriális integritást [145].

A kísérlet fő megállapítása, hogy CFP után 30 perccel történő i.c.v. 100 µg PACAP kezelés szignifikánsan csökkenti mind az APP, mind az RMO-14 immunopozitív axonok denzitását.

Míg az axonális transzportzavar nem csak az egyetlen axonpusztuláshoz vezető út, mégis az anterográd transzport ilyen jellegű károsodása, valamint az ennek következtében létrejövő axonszakadás megakadályozása a DAI egyik lehetséges kulcsfontosságú kezelési módjaként azonosítható. Megjegyzendő viszont, hogy a PACAP neuroprotektív tulajdonsága csak a CSpT területén volt szignifikáns. Ezen pályarendszeren a károsodott axonok denzitása valamint az átmérőjük és lefutásuk más, mint ami a mediális hosszanti köteg területén lévő axonokra jellemző [92, 140], ez részben magyarázhatja az eredményekben tapasztalt eltérést. Annak ellenére, hogy az utóbbi években kiterjedt kutatás folyt olyan új hatóanyagok kifejlesztésére és tesztelésére, amelyek képesek gátolni a DAI létrejöttét okozó patobiológiai mechanizmusokat, egyetlen klinikai vizsgálatban alkalmazott hatóanyag sem bizonyult hatékonynak. Ezért az aprólékos preklinikai kiválasztás feltétlenül szükséges ahhoz, hogy a későbbiekben a klinikai tesztek során a kiválasztott szer maximális hatékonyságot nyújtson.

*Vizsgálatainkat összegezve* azt szándékoztuk bemutatni, hogy a PACAP axonprotektív hatással rendelkezik, mely nem csak az impakt accelerációs, hanem a CFP állatkísérletes modellben kiváltott DAI esetében is igazolható. A korábbi, valamint

a most bemutatott eredmények alapján a PACAP potenciális jelöltnek számít, mint lehetséges hatóanyag a koponyasérülés okozta agyi károsodások klinikai kezelésében.

**5. AZ „L-2286”-EGY ÚJ POLI (ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ INHIBITOR  
NEUROPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MARAMROU-FÉLE  
IMPAKT ACCELERÁCIÓS PATKÁNY MODELLEL VÉGZETT  
KOPONYATRAUMA ESETÉBEN**

*A fejezet alapjául szolgáló publikáció:*

**Kövesdi, E.;** Bukovics, P.; Besson, V.C.; Pál, J.; Nyirádi, J.; Lückl, J.; Sümegi, B.; Dóczi, T.;Hernádi, I. and Büki, A.: A novel PARP inhibitor L-2286 in a rat model of impact acceleration head injury: an immunohistochemical and behavioral study. Int J Mol Sci. 2010 Mar 26;11(4):1253-68.

## 5.1. Bevezetés

A PARP egy kromoszómális enzim, amely a sejtmagban található, és fontos szerepet játszik a sejtek életsiklusában [34, 39, 158]. Olyan folyamatok működésében vesz részt, mint például a DNS javítás [37], és a programozott sejthalálnak, az apoptózisnak a létrejötté [70].

A fehérje három fő strukturális doménből áll [126]:

1. DNS kötő domén, amely két cink ujjat tartalmaz
2. automodifikációs domén
3. katalitikus domén

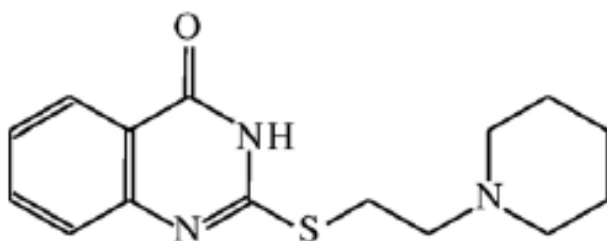
A katalitikus domén felelős a  $\text{NAD}^+$  nikotinamiddá és ADP-ribózzá történő átalakításáért [75]. Normális körülmények között a PARP a DNS-t javító folyamatokban játszik szerepet, ezért működésének gátlása a rákos betegek kemoterápiás kezelésében hasznosítható [69]. PARP túlműködés esetében az ADP-ribóz nagymértékű polimerizációjához vezet, melynek következtében a  $\text{NAD}^+$  szintje nagymértékben lecsökken az intracelluláris ATP szinttel együtt, ami nekrotikus úton bekövetkező sejthalálhoz vezet [100]. A PARP működésének ilyen jellegű aktiválódása fontos az olyan agyi szöveti károsodások létrejöttének folyamatában, amelyek összefüggésben vannak a megnövekedett oxidatív stresszel, agyi iszkémiával [45, 46], Parkinson-kórral, amit 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hoznak létre [34], valamint gerincvelői sérülés esetében is [129].

A PARP központi szerepet játszik a kaszpáztól-független, AIF közvetítette apoptózis létrejöttében. Az AIF egy evolúciósan konzervált mitokondriális flavoprotein, amely a mitokondriális membrán depolarizációja után szabadul fel [144]. Az idegsejtekben az AIF-mediálta apoptózis *in vivo* körülmények között oxidatív stressz [43, 158] kísérletes koponyatrauma okozta agysérülés és agyi iszkémia esetében jön létre. Az utóbbi években fény derül arra, hogy a PARP aktiválódása szerepet játszhat a kaszpáz-független apoptózis létrejöttében. Ezért a PARP gátlók fontos terápiás lehetőségnek számítanak koponyasérülés okozta agyi károsodás során létrejövő nekrozis illetve apoptózis létrejöttének csökkentésében [128]. A PARP gátlók neuroprotektív hatásának bizonyultak szélütés, folyadék perkussziós koponyatrauma modellben, valamint a Parkinson-kór állatkísérletes modelljeiben [2, 34, 46, 73, 86].

Az olyan PARP gátlókat, mint a benzamid analóg vegyületek és az isoquinolin származékok, már korábban is alkalmazták a PARP működésének vizsgálatára koponyasérülés okozta agyi károsodás esetében [16, 17, 86, 128]. A különböző

állatkísérletes modelleken végzett sikeres kísérletek eredményeinek alapján a PARP gátló vegyületek is fontos szerepet játszhatnak a későbbi klinikai kezelések során.

Kísérletünk során egy új fejlesztésű quinazolinone származék PARP gátló, az L-2286 (2-[(2-piperidin-1-yletil)thio]quinazolin-4(3*H*)-one) (6.ábra) hatását vizsgáltuk Marmarou-féle impakt accelerációs modell okozta koponyasérülés [53, 90] esetében a diffúz axonális károsodásra specifikus immunhisztokémiai módszerekkel, valamint magatartásvizsgálatokkal.



**6. ábra.** Az L-2286 szerkezeti képlete [108]

A vizsgálat első lépése az L-2286 dózis-hatás görbéjének meghatározása volt. A második lépésben az így meghatározott hatásos dózis hatását vizsgáltuk trauma után közvetlenül, illetve 30 perccel történő kezelés után egyrészt APP és RMO-14 immunhisztokémiai vizsgálattal az agytörzsben, másrészt különböző magatartásvizsgálatokkal.

## 5.2. Anyagok és módszerek

### 5.2.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket összesen 68 darab 300-350 g-os hím Wistar patkányokon végeztük, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék állatházában standard körülmények között tartottunk, étellel és vízzel *ad libitum* ellátva. Az állatok tartását és kezelését az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak megfelelően végeztük. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága (engedélyszám: BA 02/2000-21/2006) engedélyezte.

### 5.2.2. Marmarou-féle impakt accelerációs modell patkányon

A műtéti eljárás során az állatokat 5 percig előaltattuk 4% isoflurán (Abbot Laboratories (Magyarország) Kft.), 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> keverékével. Intubálás után a műtét alatt a patkányokat mélyen altattuk 1,5 % isoflurán, 70% N<sub>2</sub>O és 30% O<sub>2</sub> elegyével altatógép segítségével (Inspira ASV, Harvard Apparatus USA). Az állatok testhőmérsékletét minden műtét alatt állandóan mértük és folyamatosan 37 °C-on tartottuk egy speciális fűtőpad segítségével (FHC BOWDOINHAM ME 04008 USA Temperature Control). Az artériás oxigén szaturációt az egyik hátsó végtagon elhelyezett pulzus-oximéter (NONIN 8600 V) segítségével folyamatosan ellenőriztük egészen az állatok ébredéséig a műtétek után. Intubálás után az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a fejtető bőrén ejtett hosszanti bemetszéssel feltártuk a koponya Lambda és Bregma varratok közötti részét. A koponya felszín alapos letisztítása után a Lambda és Bregma kraniometriás pontok közötti tér közepére, a középvonalba egy rozsdamentes fémkorongot (10mm átmérőjű és 3mm vastagságú) rögzítettünk, amivel kivédhető egy esetleges koponyatörés. A súlyos koponyasérülés létrehozása céljából két méter magasságból 450g súlyt ejtettünk az állat koponyacsontjához rögzített fémkorongra. Trauma után a korongot eltávolítottuk a koponya felszínéről, majd a műtét után az állatok a spontán légzés visszatéréséig megfigyelés alatt álltak, s ha 20 mp-ig nem tért vissza a spontán légzés, akkor azonnal vissza lettek helyezve az altatógépre, ahol 100% O<sub>2</sub>-t kaptak a légzés normalizálódásáig. A műtét végén az állatok fejbőrét összevarrtuk, és egyesével visszahelyeztük a saját ketrecükbe. Az ál-műtött állatokon ugyan ezt a műtéti eljárást alkalmaztuk, de traumában nem részesültek.

### 5.3. Immunsztokémia

#### *L.c.v. L-2286 dózis-hatás görbéjének megállapítása APP immunhisztokémiai vizsgálattal*

Harminc perccel a trauma után folyamatos altatás alatt dózisonként 5-5 állatot 10, 50 illetve 100 µg/patkány 5 µl fiziológiás sóoldatban feloldott, i.c.v. adott L-2286-al kezeltünk a következő koordináták alapján a Bregmát 0:0 koordinációs pontnak tekintve: AP:-1,0; L: 1,5; V:-3,5;. A vehikulum kezelt csoport (n=5) ugyanekkora mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott a hatóanyaggal kezelt csoportokkal megegyező módon. Trauma után 2 órával ezeket az állatokat a „4.2.5. Immunhisztokémia”-részben



ismertetett eljárásnak vetettük alá azzal a különbséggel, hogy csak az APP-immunopozitív axonok denzitását határoztuk meg a CSpT agytörzsi szakaszában.

#### Terápiás ablak meghatározása i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 esetében

A vizsgálat következő részében az állatok egy részét közvetlenül (n=6), a másik részét 30 perccel a trauma után (n=6) az előbb ismertetett módon i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-tal kezeltünk, melyet a jobb oldali agykamrába juttattunk (oldószer: 5µl fiziológias sóoldat). A két kezelési időpontnak megfelelően a 2 vehikulum kezelt csoportot (n=6;6) ezzel megegyező módon 5µl/patkány fiziológias sóoldattal kezeltük. Az immunhisztokémiai vizsgálathoz a trauma után 2 órával ezeket az állatokat is a „4.2.5. Immunhisztokémia”-részben ismertetett eljárásnak vetettük alá.

#### A szövettani metszetek elemzése Image-Pro Plus v 5.0.1. segítségével

Az APP immunopozitív axonokat fénymikroszkóp (Nikon), illetve hozzákapcsolt digitális fényképezőgép (Spot Rt), valamint számítógépes képvizsgáló program segítségével (Image-Pro Plus v5.0.1) elemeztük. Állatonként 6 agytörzsi szakasról készítettünk digitális képet 10-szeres nagyításban. 180.000 µm<sup>2</sup>-es területen mind a CSpT, mind az MLF területén a károsodott axonokat összeszámoltuk.

#### Statisztikai analízis

Az L-2286, illetve vehikulum kezelt csoport közötti károsodott axonok denzitásbeli (átlag/mm<sup>2</sup>) különbségét mindkét vizsgálati időpontban Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

### **5.4. Magatartásvizsgálatok**

#### Beam-balance teszt

A műtét előtt 1 nappal minden egyes kísérleti állatot addig edzettük, amíg képesek lettek az egyensúlyukat megtartani 60 mp-ig egy 1,5cm szélességű fából készült gerendán, amit 60cm magasságban helyeztünk el egy szivacspárna felett. Minden kísérleti csoportban lévő állatot műtét után 1 órával és a műtétet követően 1-7 napig naponta egyszer teszteltük, majd az egyes csoportok napi eredményeit értékeltük.

A következő besorolási rendszer alapján értékeltük az egyes állatok teljesítményét [33]:

1. egyensúlyi helyzetet vesz fel a gerendán
2. megfogja a gerenda oldalát és/vagy egyenetlen mozgásokat tesz
3. átkarolja a gerendát vagy „csúszkál” rajta leesés nélkül
4. megkísérli az egyensúlyi helyzet felvételét, de közben leesik
5. függ a gerendán, majd leesik
6. egyáltalán nem kísérli meg a fentmaradást a gerendán

### Open-field teszt

Az open-field tesztet a trauma utáni spontán lokomotoros aktivitás vizsgálatára használtuk. Az eszköz egy 70x70cm alapterületű és 50cm magasságú láda, amelynek az alja 16 egyenlő méretű négyzetre van osztva. A centrális zóna a doboz közepén lévő 2x2 négyzet, a perifériás zóna a külső maradék 3x4 négyzet. A vizsgálat napján fél órával a tesztelés előtt az állatokat a vizsgálószobába vittük. Ezután minden egyes állatot 5 perces időtartamra az open-field közepére helyeztük és videokamera segítségével rögzítettük az egyes állatok tevékenységét. A „crossingok” (min. 3 láb egy négyzetben) és ágaskodások számát értékeltük az 5 perces vizsgálati időtartam alatt.

### Emelt keresztpalló teszt

Az emelt keresztpalló teszt a szorongás vizsgálatára alkalmas. Az eszköz 1m magasságban helyezkedik el. Négy, közepén egymásba nyíló egyenlő méretű karból áll (45 cm hosszú és 10 cm széles 1-1 kar), amelyből 2 kar 3 oldala teljesen nyitott (nyitott kar), viszont a másik 2 kar 3 oldala 30cm magas fallal van körülvéve (zárt kar). A vizsgálat napján fél órával a tesztelés előtt az állatokat a vizsgálószobába vittük. Ezután minden egyes állatot 5 perces időtartamra a berendezés közepére helyeztünk és videokamera segítségével rögzítettük az egyes állatok tevékenységét. A felvételek alapján a következő paramétereket vizsgáltuk az egyes csoportokban: fejbedugások („head dip”) száma a nyitott karba, a mellső két lábbal való belépések száma a nyitott karba, valamint a nyitott illetve zárt karban töltött időtartam.

### Statisztikai analízis

A magatartásvizsgálatok során az egyes csoportokban szereplő állatok adatait összesítettük. A beam-balance teszt eredményeit nem-parametrikus Dunn-féle poszt tesztel kiegészített egyutas ANOVA tesztel értékeltük. Az open-field és az emelt

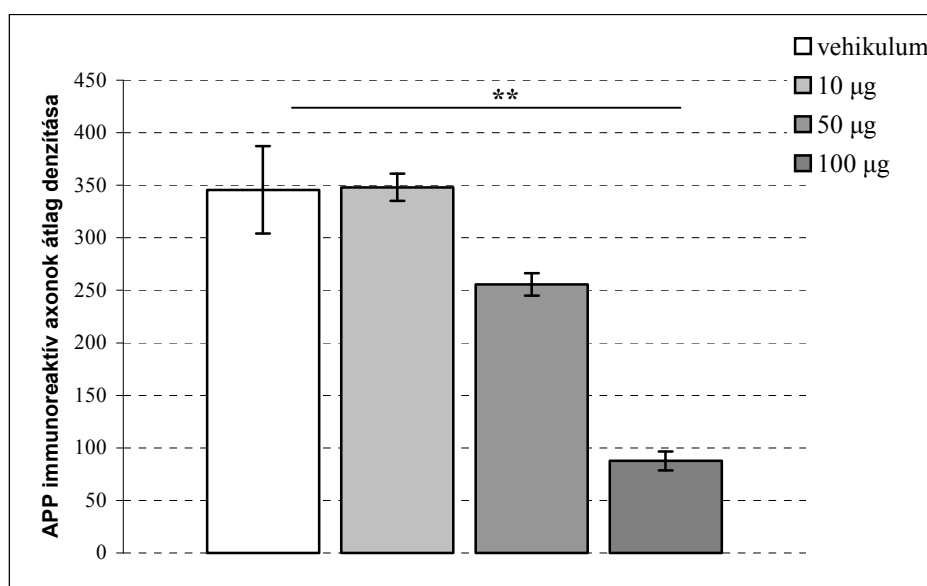
keresztpalló tesztek adatait Dunnett-féle poszt tesztel kiegészített egyutas ANOVA-tesztel értékeltük. Minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor \* $p < 0,05$  és \*\* $p < 0,01$  értékeket határoztunk meg szignifikánsnak.

## 5.5. Eredmények

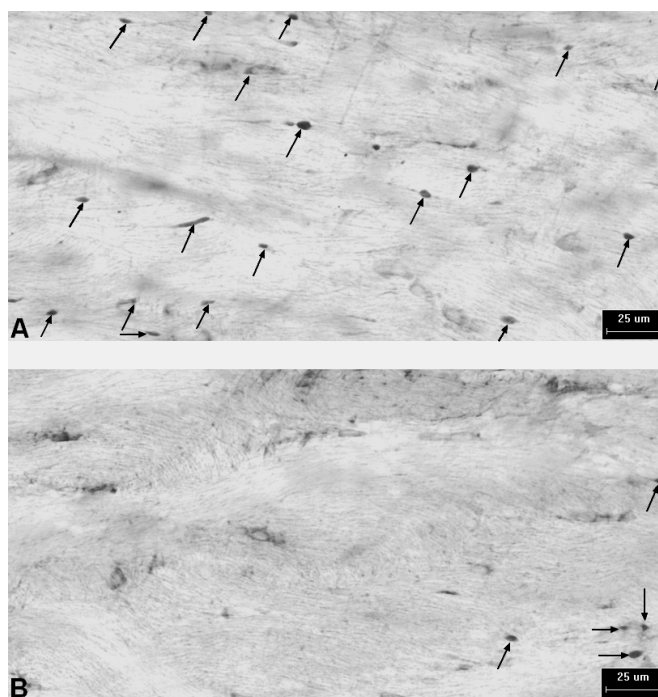
### 5.5.1. Immunhisztokémia

#### Az i.c.v. L-2286 hatása súlyos koponyasérülés után

Az immunhisztokémiai vizsgálatok első részében az L-2286 három különböző dózisának hatását vizsgáltuk. A trauma után 30 perccel történő i.c.v. 10  $\mu\text{g}$ /patkány L-2286-al kezelés hatástalannak bizonyult, mivel nem csökkentette a jelölt axonok denzitását a CSpT-ben. Az i.c.v. 50  $\mu\text{g}$ -al történő kezelés ezzel ellentétben viszont már csökkentette az APP immunopozitív axonok számát, de ez a vivőanyaggal kezelt állatok értékeihez képest statisztikailag még nem bizonyult szignifikánsnak. A három vizsgált dózis közül csak az i.c.v. 100  $\mu\text{g}$ -al történő kezelés bizonyult kellően hatásosnak, így a vizsgálatok további részében ezzel a dózissal folytattuk a munkát (7-8. ábra).



**7.ábra** APP immunhisztokémiai vizsgálat: különböző dózisé i.c.v. L-2286 hatása 30 perccel a trauma után. Az adatok átlag/mm<sup>2</sup>  $\pm$  SEM-ben kifejezve (\*\*  $p < 0,01$  a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).



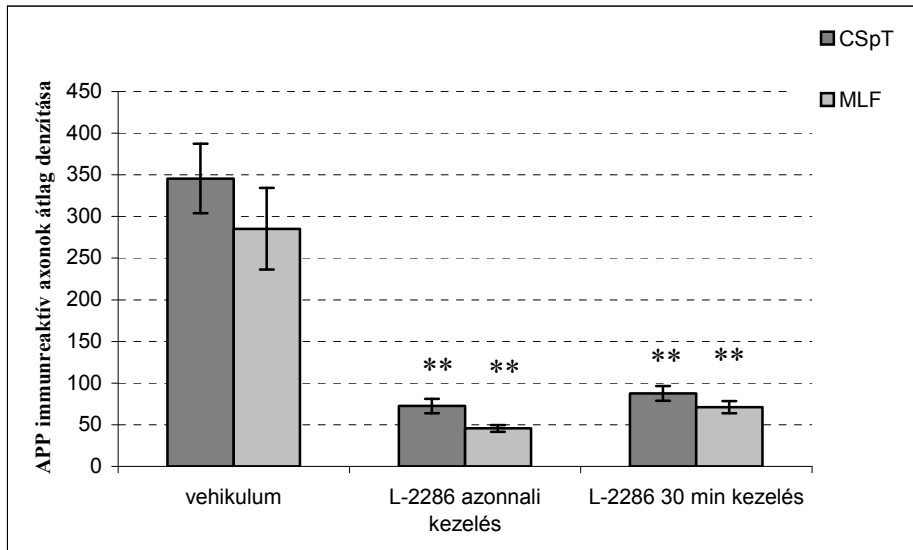
**8.ábra** APP-IR axonok a CSpT terület 2 órával a koponyasérülés után vehikulum (A) illetve i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-al történő kezelés esetében (B).

A szövettani vizsgálatok második részében az első vizsgálat során hatásosnak bizonyult dózist vizsgáltuk a trauma után két különböző időpontban történő kezelés után immár nem csak APP, hanem RMO-14 immunhisztokémiai analízissel is.

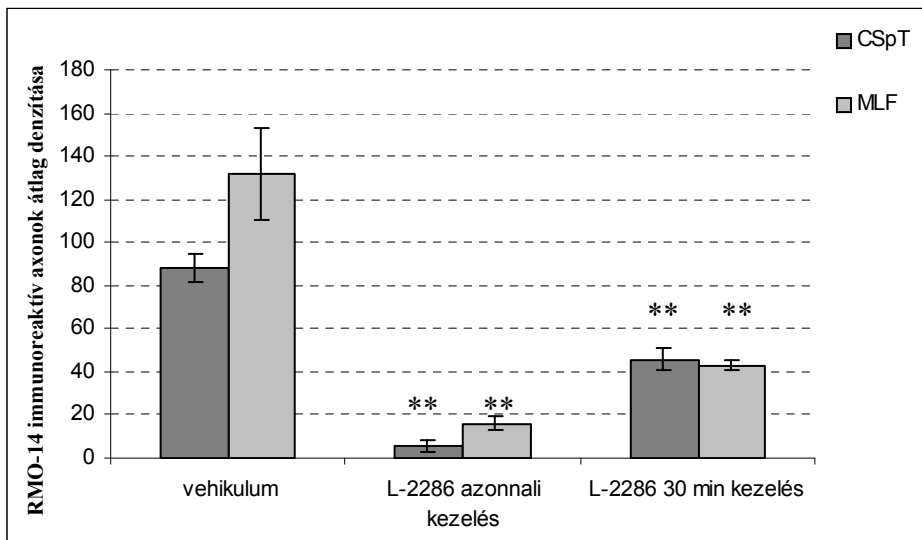
Az APP immunhisztokémiai analízis fénymikroszkóppal történő elemzése során megállapítottuk, hogy mind a trauma után közvetlenül, mind a 30 perccel történő i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-al történő kezelés a vehikulummal kezelt állatok eredményeihez képest szignifikánsan csökkentette a károsodott axonok denzitását (károsodott axonok száma/mm<sup>2</sup>) mind a CSpT-ben, mind az MLF-ben. A két kezelési időpont között statisztikai különbség nem volt kimutatható (9. és 11. ábra).

Az RMO-14 immunopozitív axonok esetében az előbbiekhöz hasonlóan mindkét időpontban történő kezelés hatásosnak bizonyult, vagyis mind az azonnali, mind a trauma után 30 perccel történő kezelés szignifikánsan csökkentette az RMO-14 immunopozitív axonok számát mindkét vizsgált agyterületen. Megjegyzendő viszont, hogy ellentétben az APP immunhisztokémiai vizsgálattal, ebben az esetben a két kezelési időpont között szignifikáns különbség volt kimutatható, miszerint a súlyos trauma után közvetlenül beadott 100 µg/patkány L-2286 nagyobb mértékben képes

csökkenteni az RMO-14 immunopozitív axonok számát, ami mind a CSpT, mind az MLF területén egyaránt megfigyelhető volt (10. és 11. ábra).



**9. ábra** APP immunoreaktív axonok denzitása a CSpT és MLF területén. Az adatok átlag/mm<sup>2</sup> ± SEM-ben kifejezve (\*\* p<0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).



**10. ábra** RMO-14 immunoreaktív axonok denzitása a CSpT és MLF területén. Az adatok átlag/mm<sup>2</sup> ± SEM-ben kifejezve (\*\* p<0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

	<i>vehikulum</i>	<i>L-2286 azonnali kezelés</i>	<i>P érték a vehikulumhoz képest</i>	<i>L-2286 30 percel a trauma után</i>	<i>p érték a vehikulumhoz</i>
<b>APP immunopozitív axonok</b>					
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 (**)
<b>RMO-14 immunopozitív axonok</b>					
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 (**)

**11.ábra** Trauma után azonnal illetve 30 perccel történő kezelés i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-al: APP and RMO-14 immunhisztokémiai vizsgálat. Az adatok átlag/mm<sup>2</sup> ± SEM-ban kifejezve (\*\* p<0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

### 5.5.2. Magatartásvizsgálatok

#### Az i.c.v. L-2286 hatása a beam-balance tesztben

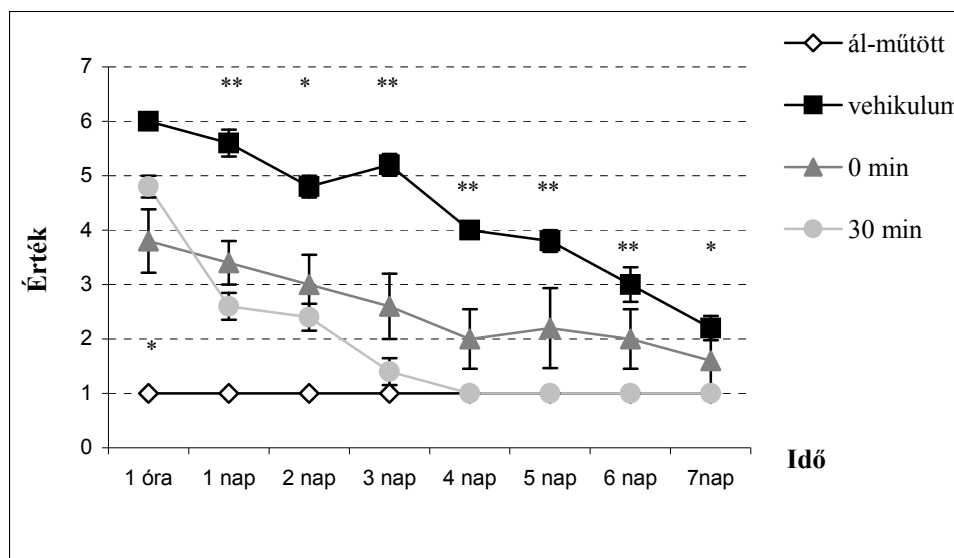
A beam-balance tesztben az L-2286 súlyos trauma következményeként kialakuló károsodott motoros funkciókra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A teszt során az ál-műtött állatok esetében semmilyen jellegű motoros teljesítmény-beli károsodást nem tapasztaltunk. Azoknál az állatoknál, amelyek a trauma után csak vivőanyagot (vehikulum kezelt) kaptak, a motoros teljesítmény nagymértékben leromlott és az utolsó vizsgálati napra sem érték el az ál-műtött állatok teljesítményét.

A trauma után azonnal történő i.c.v. L-2286 kezelés ugyan javította a trauma hatására kialakuló motoros teljesítmény károsodását, de a vehikulummal kezelt csoporthoz viszonyítva szignifikáns különbséget csak az első vizsgálati időpontban tapasztaltunk (trauma után 1 óra). A többi időpontban szignifikáns különbséget a vehikulum és a trauma után közvetlenül L-2286-al kezelt csoport között nem tapasztaltunk, valamint a teljes vizsgálat alatt ezen állatok a maximálisan elérhető értéket (1) nem érték el.

Ezzel ellentétben a trauma után 30 perccel L-2286-al kezelt állatok a negyedik vizsgálati napon ezt az értéket érték el (1) és a további három nap során ezt a teljesítményt meg is tartották. Továbbá ezen csoport -a vehikulummal kezelt állatok

beam-balance beli teljesítményéhez képest- az első vizsgálati időpont teljesítményét leszámítva a teljes vizsgálat alatt szignifikánsan jobban teljesítettek.

A két kezelési módot összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a beam-balance tesztben ugyan mindkettő javítja a károsodott motoros funkciókat, de a trauma után 30 perccel történő i.c.v. 100 µg/patkány L2286-al történő kezelés hatásosabbnak tűnik, mint a trauma után azonnal történő kezelés ( 12. és 13. ábra).



**12.ábra** Az i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 hatása a beam-balance tesztben. Az adatok beam-balance érték ± SEM-ben kifejezve (\*p<0,05 és \*\* p<0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

#### Az i.c.v. 100µg/patkány L-2286 hatása az open-field tesztben

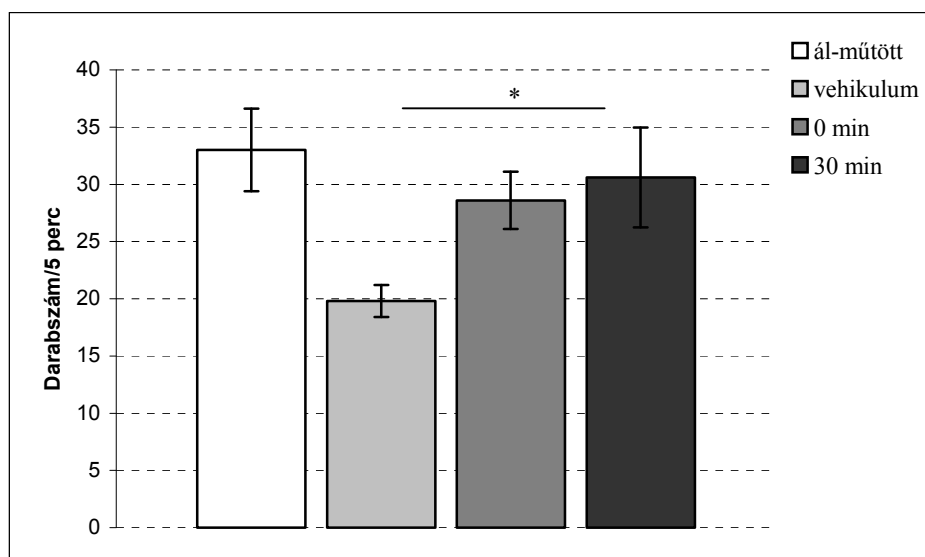
Az open-field tesztben a lokomotoros aktivitás károsodását vizsgáltuk. Eredményeink szerint a fiziológiás sóoldattal kezelt (vehikulum) állatoknál crossing és az ágaskodások száma szignifikánsan kevesebb, mint amit a traumában nem részesült ál-műtött állatok esetében regisztráltunk. Tehát ezen állatok lokomotoros aktivitása károsodott.

A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a vehikulum kezelt állatokhoz képest a trauma után közvetlenül L-2286-al kezelt állatoknál javulás nem volt megfigyelhető. A három vizsgált paraméter közül a trauma után 30 perccel történő kezelés L-2296 is csak a mosakodások számát növelte szignifikánsan (13 és 14. ábra). Összeségében megállapítottuk, hogy az i.c.v. 100µg/patkány L-2286-al történő kezelés egyik kezelési időpontban sem javította jelentős mértékben a károsodott lokomotoros aktivitást.

	ál-műtött	vehikulum	p érték az ál-műtöthöz képest	L-2286 azonnali kezelés	p érték a vehikulumhoz képest	L-2286 30 perccel a trauma után	p érték a vehikulumhoz képest
<b>Beam-balance</b>							
1 óra (érték)	1	6	p<0,001 (***)	3,8±0,58	p<0,05(*)	4,8±0,2	nsz
1 nap (érték)	1	5,6±0,24	p<0,001 (***)	3,4±0,4	nsz	2,6±0,24	p<0,01(**)
2 nap (érték)	1	4,8±0,2	p<0,001(***)	3±0,55	nsz	2,4±0,24	p<0,05(*)
3 nap (érték)	1	5,2±0,2	p<0,001 (***)	2,6±0,6	nsz	1,4±0,24	p<0,01(**)
4 nap (érték)	1	4	p<0,001(***)	2±0,55	nsz	1	p<0,01(**)
5 nap (érték)	1	3,8±0,2	p<0,001 (***)	2,2±0,73	nsz	1	p<0,01(**)
6 nap (érték)	1	3±0,32	p<0,001 (***)	2±0,55	nsz	1	p<0,01(**)
7 nap (érték)	1	2,2±0,22	p<0,001 (***)	1,6±0,67	nsz	1	p< 0,05(*)
<b>Open-field</b>							
„Crossing” (db)	117,4±2,77	75,8±6,09	p<0,001 (***)	98,4±11,45	nsz	90±15,99	nsz
Mosakodás (db)	33±3,61	19,8±1,39	p<0,001 (***)	28,6±2,5	nsz	30,6±4,37	p<0,05 (*)
Ágaskodás (db)	1,4±0,93	1,2±0,97	nsz	0,6±0,24	nsz	1,2±0,73	nsz
<b>Emelt keresztpalló</b>							
Fejbetétel nyitott karba (db)	6±1,58	10,4±0,51	p<0,05 (*)	7±1,13	p<0,05(*)	6,6±1,21	p<0,05 (*)
Belepés a nyitott a karba (db)	4,4±1,21	2,6±0,87	nsz	3,6±0,26	nsz	3,2±0,66	nsz
Nyitott karban töltött idő (mp)	46,8±10,17	1,6±0,98	p<0,01(**)	78,8±2,11	p<0,01(**)	68±13,67	p<0,01 (**)
Zárt karban töltött idő (mp)	253,2±10,17	298,4±0,98	p<0,01(**)	221±2,11	p<0,01(**)	232,2±13,67	p<0,01 (**)
Ágaskodás a zárt karban (db)	17,6±0,98	12,6±0,51	p<0,01 (**)	12,2±1,18	nsz	15,4±2,16	nsz

**13.ábra** Az i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 hatása a súlyos koponyatrauma után a beam-balance, open-field és emelt keresztpalló tesztben (nsz: nem szignifikáns különbség). Az adatok az adott magartás vizsgálat értéke (érték, darab, mp) ± SEM-ben kifejezve az ál-műtött ill. vehikulummal kezelt állatokhoz képest).





**14.ábra** L-2286 hatása a mosakodások számára az open-field tesztben. Az adatok darabszám/5 perc  $\pm$  SEM-ben kifejezve (\* $p < 0,05$  a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

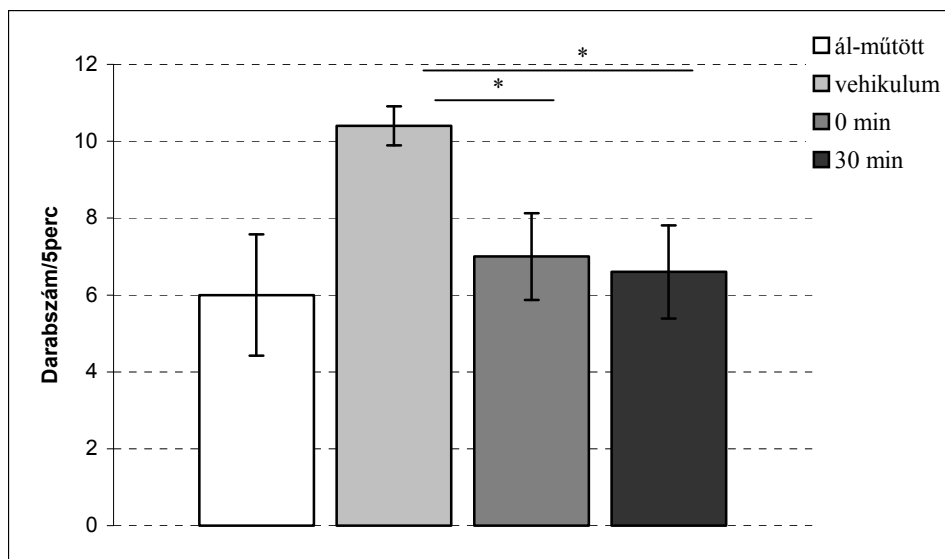
Az i.c.v. 100  $\mu$ g/patkány L-2286 hatása az emelt keresztpalló tesztben

Ebben a tesztben a trauma után emberben is gyakran kialakuló szorongás szintjének változását vizsgáltuk az L-2286-al történő kezelés tükrében.

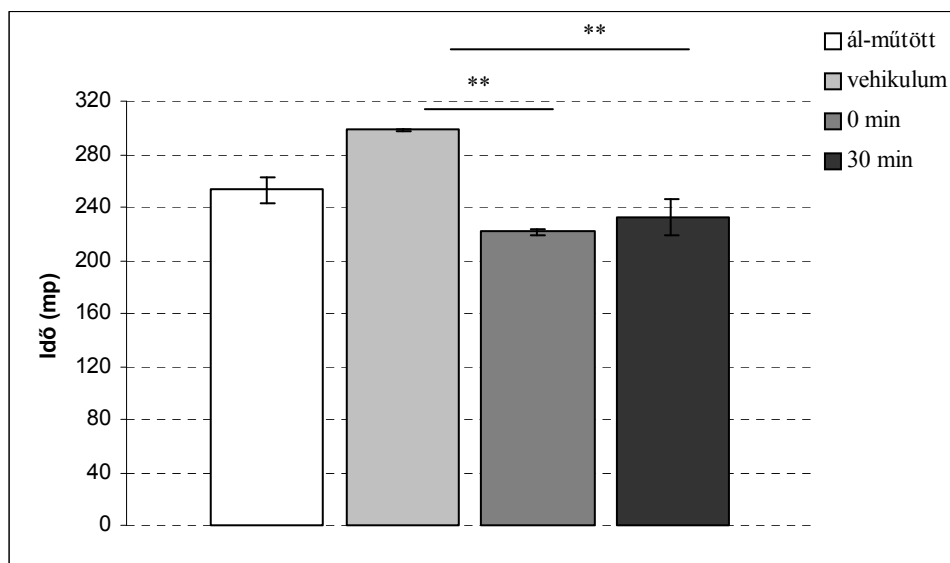
Eredményeink elemzése során megállapítottuk, hogy a sérülés után a vehikulummal kezelt állatoknál szorongás volt megfigyelhető, ugyanis az ál-műtött állatokhoz képest sokkal kevesebb időt töltöttek a védelmet nem nyújtó nyílt karban, vagyis előnyben részesítették a zárt kart. Szignifikáns különbséget az ál-műtött és a vehikulum kezelt állatok teljesítménye között a következő paraméterek esetében tapasztaltunk: fejbetétel nyitott karba, nyitott illetve zárt karban töltött idő.

Az L-2286-al kezelt állatok esetében azt tapasztaltuk, hogy esetükben az a megemelkedett szorongási szint, amit a vivőanyaggal kezelt állatok esetében tapasztaltunk, szignifikánsan lecsökkent, mivel hozzájuk képest szignifikánsan több időt töltöttek a nyitott karban és ezzel együtt szignifikánsan kevesebb időt a zárt karban.

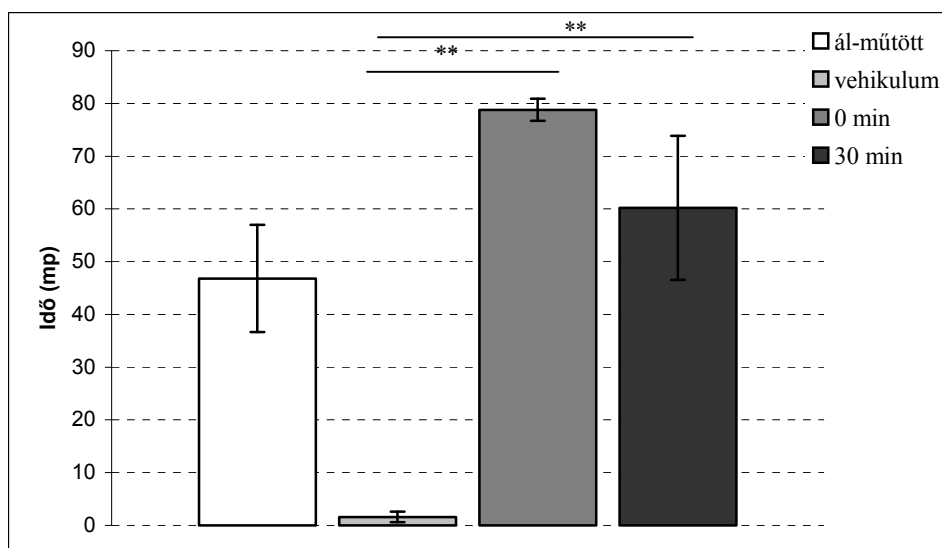
A trauma után 30 perccel történő kezelés esetében is hasonló eredményt kaptunk, de az ál-műtött állatokhoz képest ez a kismértékben túlzott “bátorság” már kevésbé volt megfigyelhető (13. valamint 15-17. ábra). Tehát az i.c.v. L-2286 kezelés csökkentette a trauma után fellépő szorongás szintjét.



**15.ábra** Az i.c.v. 100µg/patkány L-2286 hatása a fejbetétel nyitott karba paraméterre. Az adatok darabszám/5 perc ± SEM-ben kifejezve (\*p<0,05 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).



**16.ábra** Az i.c.v. 100µg/patkány L-2286 hatása a zárt karban töltött időre. Az adatok mp ± SEM-ben kifejezve (\*p<0,05 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).



**17.ábra** Az i.c.v. 100 $\mu$ g/patkány L-2286 hatása a nyitott karban töltött időre. Az adatok mp  $\pm$  SEM-ben kifejezve (\* $p < 0,05$  a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

## 5.6. Megbeszélés, következtetések

Korábbi vizsgálatok alapján a Marmarou-féle impact accelerációs modell okozta diffúz agykárosodás a motoros és magatartási/kognitív funkciók károsodását is eredményezi [71, 155]. A DAI korábban ismertetett kórfolyamatait a neurofilament kompaktációt és az axoplazmatikus transzport zavarát jelző markerek segítségével vizsgáltuk az L-2286 hatékonyságának feltárására. Eredményeink igazolták, hogy mindkét marker alapján szignifikánsan csökkent az axonkárosodás mértéke a motoros funkciók pályarendszerét reprezentáló CSpT-ben, illetve a szenzoros információt közvetítő MLF-ban.

Az APP-immunoreaktív és RMO-14-immunoreaktív axonok denzitásának eltérő mértékű csökkenése megerősítette azt a megfigyelést, hogy az axon-károsodás heterogén jelenség, mely nem minden tengelyfonatban jelenti ugyanazon kórfolyamatok aktiválódását [91, 140]. Ez a megfigyelés újra alátámasztja, hogy az igazságügyi orvostani gyakorlatban évtizedek óta a DAI egyedüli markerének tartott APP kimutatása messze alulbecsülheti a károsodott axonok számát, sőt, esetleges fals negatív véleményre is vezethet.

A funkcionális kimenetelt értékelő kísérletek eredménye alapján megállapítottuk, hogy a DAI ezen modelljében, amely elsősorban a motoros rendszert károsítja, a PARP inhibitorral történő utókezelés képes volt javítani a trauma

következtében károsodott motoros teljesítményt (beam-balance teszt), és nagymértékben csökkenteni a trauma után kialakuló szorongás szintjét (emelt keresztpalló teszt), vagyis javítja a funkcionális kimenetelt.

E vizsgálatok nem nyújtottak arra választ, hogy a PARP inhibitor pozitív hatását kizárólag a DAI gátlása révén okozza, vagy esetleg szerepet játszhat a Marmarou-féle koponyatrauma modellben igazolt diffúz neurális károsodás kivédése is.

## **6. TRANZIENS FOKÁLIS AGYI ISZKÉMIA OKOZTA „SÖTÉT” IDEGSEJTEK SORSA NEM-NEKROTIKUS ES NEM EXCITOTOXIKUS SZÖVETI KÖRNYEZETBEN: NEUROBIOLÓGIAI KÖVETKEZTETÉSEK**

*A fejezet alapjául szolgáló publikáció:*

**Kövesdi E., Pál J., Gallyas F.:** The fate of „dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects. *Brain Res.* 2007 May 25;1147:272-83.

## 6.1. Bevezetés

Több mint egy évszázada Flesh [52] mutatott rá arra, hogy különböző neurológiai betegségek következtében meghaltak agyában drámai mértékben (>50%) zsugorodott és hiperkromatikus idegsejtek találhatók, különféle lokalizációban és különféle arányban. Ezen - tradicionálisan „sötét”-nek nevezett - idegsejtek patogenezise vitatott tárgy a neuropatológiában [4], amely ezeket négy morfológiai típusba sorolja [67]: Huntington típusúak (Huntington-kórban), artefakt típusúak (*post mortem* képződnek különböző mechanikai hatásokra), reverzibilis típusúak (hipoglikémia, epilepszia vagy iszkémia korai stádiumában), valamint irreverzibilis típusúak (hipoglikémia, epilepszia vagy iszkémia késői stádiumában találhatók meg).

Az utóbbi néhány évben egyes kutatók új eredményeket mutattak be koponyatrauma, elektromos sokk, vagy hipoglikémia hatására - viszonylag ép szöveti környezetben képződő - „sötét” idegsejtek képződési mechanizmusára, regenerációs képességére illetve pusztulásának módjára vonatkozóan [35, 56, 57, 160]. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a „sötét” idegsejteknek egyetlen sejtbiológiai típusa van, a fenti négy morfológiai típust a kóros környezet „erőszakolja” rájuk [60].

Jelen kísérlet során az *arteria cerebri media* - intraluminárisan bevezetett vékony filamentel való [82]egy-órás elzárásának hatására – ép szöveti környezetben - képződő „sötét” idegsejtek morfológiai változásait követtük nyomon a túlélési idő függvényében, abból a célból, hogy iszkémia esetében is igazak-e a fenti három esetben találtakból levont neurobiológiai következtetések.

## 6.2. Anyagok és módszerek

### 6.2.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket 200-220 g-os hím Wistar patkányokon végeztük, amelyeket a Pécsi Idegsebészeti Klinika kutatólaboratóriumának állatházában standard körülmények között tartottuk, étellel és vízzel *ad libitum* ellátva. Az állatok tartását és kezelését az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak megfelelően végeztük.

### 6.2.2. Patkány tranziens fokális agyi iszkémia modell

A műtétek alatt az állatokat altatógép segítségével (SurgiVet respirator, Waukesha, WI, USA) lélegeztettük 2,5% isoflurane, 30% oxigén és 67,5% dinitrogén-oxid keverékével. 24 patkány esetében a jobb oldali *arteria cerebri media*-t a Koizumi és mtsai. által leírt műtéti eljárás szerint [82]1 órára lezártuk. A műtét során a nyakon a

jobb oldali *arteria carotis* területét feltártuk, majd az *arteria carotis* fő és *pterigopalatinus* ágát elkötöttük. A *arteria carotis* külső ágán keresztül egy lekerekített végű 4-0-s műanyag sebészeti fonalat vezettünk fel az *arteria cerebri media*-hoz, majd 1 órán keresztül ott tartottuk. Végül a fonalat eltávolítottuk és a keringést helyreállítottuk.

Közvetlenül ezután 3 darab patkányt szíven keresztül perfundáltunk 500 ml glutáraldehides fixálóval. A többi állat esetében különböző túlélési időket alkalmaztunk, ezen időpontokban a perfúzió előtt az állatokat intraperitoneálisan 25 mg/ml thiopental és 5 mg/ml diazepam 1:1 arányú keverékével 2 ml-t beadva testsúly-kilogrammonként túlaltattuk. Glutáraldehides fixálás esetében a túlélési idők a következők voltak: 1 óra, 4 óra, 1 nap, 2 nap és 1 hét (vizsgálati időpontonként 3 darab állat), míg a formaldehides fixálás esetében: 1 óra, 1 nap és 2 nap (vizsgálati időpontonként 2 darab állat).

További 9 állat a fent ismertetett műtéti eljárásán keresztül esett át (ál-műtött, továbbiakban kontroll állatok), de ezeknél a fonalat közvetlenül a behelyezés után eltávolítottuk. Ezen kontroll patkányok közül hármat közvetlenül a műtét után, majd a maradék 3-3 patkányt 1 órával illetve 24 óra elteltével szíven keresztül perfundáltuk.

### 6.2.3. Szövetteni feldolgozás

A szíven keresztüli perfúzió után 1 nappal az agyakat eltávolítottuk a koponyából [29]. A glutáraldehiddel fixált agyak középső 2/3-részből 150 µm vastagságú metszeteket készítettünk frontális síkban metszve vibratom segítségével. Minden ötödik metszetet egy speciális ezüstözési eljárással festettünk meg, amely specifikus a „sötét” idegsejtekre [59] és reprodukálható eredményt képes nyújtani [103]. A módszer alapján a metszeteket felszálló alkohol-sorban (1-propanol) víztelenítettük, majd 16 h-n át 56 °C fokon 0,8 % kénsavat és 2 % vizet tartalmazó 1-propanol oldatban inkubáltuk (észterifikáció). Ezután a metszeteket rehidráltuk leszálló alkohol sorban (1-propanol), 10 percig 1 %-os ecetsavba helyeztük, majd egy speciális fizikai előhívó oldatba merítettük, amíg világos barnává váltak.

Az elektronmikroszkópos szövetteni feldolgozáshoz 2x2 mm<sup>2</sup>-es darabokat vágunk ki a *caudo putamen* és temporális *cortex* azon területeiről, ahol az ezüstözés után kompaktálódott idegsejteket vagy axonokat tartalmaztak az előbb ismertetett eljárással megfestett metszetek. Ezeket a darabokat egy órán keresztül, szobahőmérsékleten utófixáltuk 2 %-os ozmium tetroxid és 3 %-os kálium ferrocianid

1:1 arányú keverékével, ezután Durcupan ACM-be ágyasztuk, majd 1 µm vastagságú félvékony metszeteket készítettünk. Ezeket a metszeteket 0,05 % toluidin kéket, 0,05 % nátrium-tetraborátot és 0,1 % szacharózt (pH 9,5) tartalmazó oldatba helyeztük 1 percre, 90 Celsius fokon. A metszetek toluidin-kékkel való festésével azonosítottuk a vizsgálni kívánt területeket. Ezután vékony (50 nm) vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket „gridekre” húztunk, majd 5%-os uranil-acetáttal 2 percig és 0,5 %-os ólom-citráttal 1 percig kezeltük a metszetek kontrasztosításának céljából. Az ultrastrukturális vizsgálatokat JEOL JEM 1200EX típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal hajtottuk végre.

A formaldehiddel fixált agyak középső 2/3-át paraffinba ágyasztuk, majd 10 µm vastagságú szeltekre metszettük szánkamikrotóm segítségével. Minden tizedik metszetet 0,1 %-os krezil ibolyával (oldószer: 0,01%-os ecetsav) vagy 1%-os savanyú fukszin (oldószer: 0,01%-os ecetsav) oldattal festettük. Ezekből a metszetekből olyan területeket választottunk ki az apoptózis vizsgálatához, amelyek az előbb említett festési eljárások során károsodott idegsejteket tartalmaztak. Az így kiválasztott darabokat in situ sejthalál detektáló (TUNEL) kereskedelmi forgalomban kapható kit-el (Roche, Cat. No. 11684817910) a termék használati utasítása szerint feldolgoztuk és fénymikroszkóppal értékeltük.

### **6.3. Eredmények**

#### **6.3.1. Fénymikroszkópos megfigyelések**

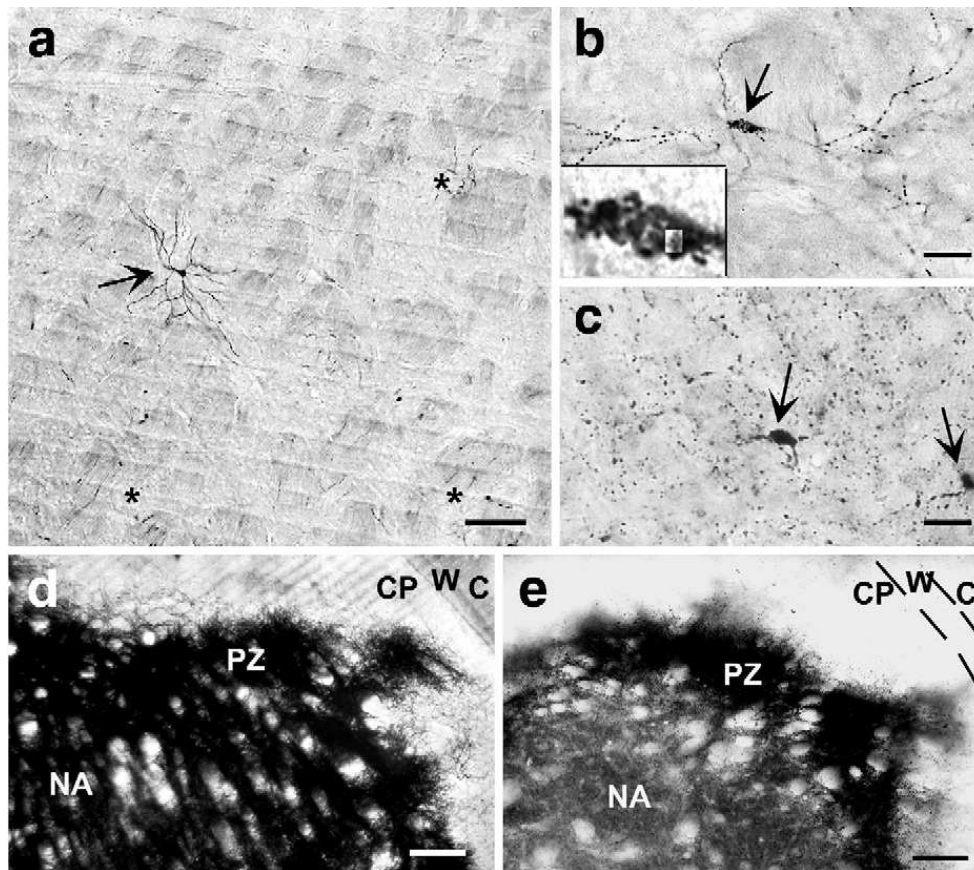
A filament eltávolítása után azonnal fixált patkányokban a jobb oldali *caudo putamen* néhány idegsejtjének szóma-dendrit doménje homogéneen ezüstöződött (18. ábra a). Ez volt megfigyelhető néhány piramis sejtnél is a jobb oldali temporális *cortex* területén (19. ábra a). Az 1, vagy több órát túlélő állatoknál a natív, festetlen metszeten megfigyelhető volt a károsodott (nekrotikus, excitotoxikus) terület elhelyezkedése fázis-kontraszt vizsgálat alapján (20. ábra e). Az 1 napig túléltetett állatoknál ezen a területen a temporális *cortex* számos megduzzadt dendritet és asztrocita nyúlványt, továbbá normál kinézetű idegsejtet, oligodendroglitát, pericitát és endothel sejtet tartalmaztak, továbbá néhány „sötét” idegsejtet. Egy, 4 és 24 óra túlélés után a károsodott idegsejtek szómájában és dendritjei mentén mitokondrium méretű ezüst-göbök voltak megfigyelhetők (18. ábra b és 19. ábra c), ami a regenerálódó „sötét” idegsejtekre jellemző tulajdonság [35]. Egy óra túlélés után a nekrotikus területen ill. 1 és 4 óra túlélés után a temporális *cortex* excitotoxikus területén számos olyan homogéne-



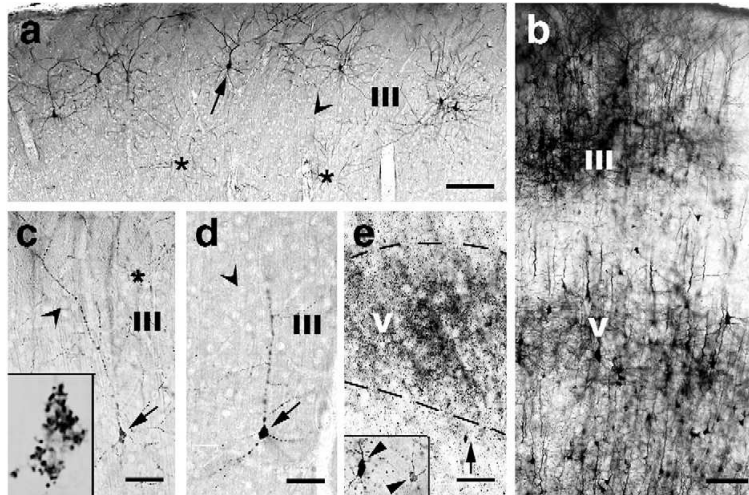
ezüstöződött idegsejt figyelhető meg, amelyek szóma-dendrit doménjeit nem lehetett külön-külön megfigyelni (18. ábra d; 19. ábra b).

Egy ill. 2 nap túlélés után néhány stellátum illetve piramis idegsejtnél megfigyelhető volt a szóma homogén ezüstözése, míg a dendritekben a mitokondriumoknál nagyobb méretű ezüst-göbök álltak (18. ábra c; 19. ábra d), ami a pusztuló "sötét" idegsejtek jellegzetes tulajdonsága [35]. Egy nap túlélés után a károsodott terület széli területén (penumbra zóna) ezüstöződő neuronális elemek „tömör” halmaza volt megfigyelhető (18. ábra e). Ezeknél az állatoknál az ezüstözés után mind pusztuló, mind regenerálódó „sötét” idegsejtek voltak áthatók, különösen az excitotoxikus terület perifériáján (19. ábra e). Hat nap túlélés után csak néhány fagocitáló sejt jelenléte jelezte a már elpusztult „sötét” idegsejtek helyét (20. ábra d). Toluidin-kékkel homogénean festődtek a frissen-képződött „sötét” idegsejtek magja, citoplazmája és fő dendritjei mind a temporális *cortex*, mind a *caudo putámen* területén (21. ábra a). Egy nappal később a "sötét" idegsejtek festődésének intenzitása megnőtt (20. ábra b). Két napot túlélő állatoknál viszont már fragmentálódásuk (20. ábra c), míg 6 nap túlélés után pusztulásukat bizonyító fagociták voltak megfigyelhetők (20. ábra d).

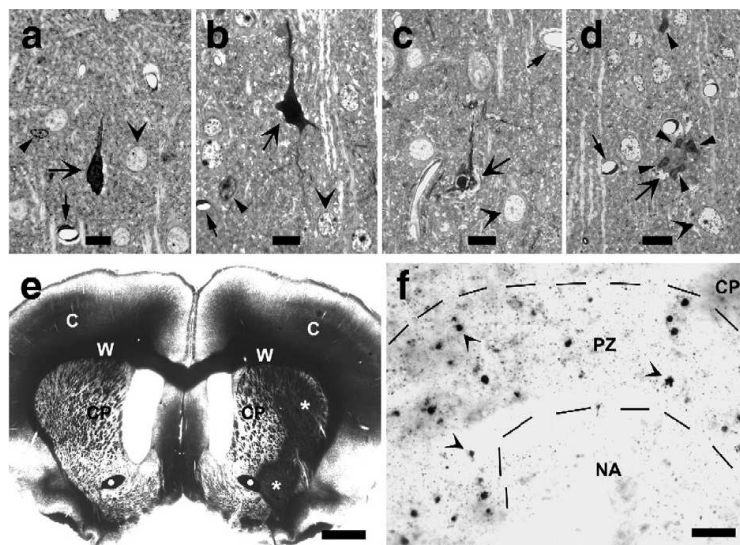
TUNEL-pozitív sejtmagok a csak a nekrotikus területek széli részein voltak megfigyelhetőek, főleg az egynapos túlélés után (20. ábra f).



**18.ábra:** Ezüstözödött „sötét” idegsejtek fénymikroszkópos képei a *caudo putamen* területén az *arteria cerebri media* 1 órás elzárása után. Egy órás *arteria cerebri media* elzárás után azonnal perfundált (a), 1 órát (b and d) vagy 1 napot (c és e) túlélt állatok szövettani képei.



**19.ábra** Ezüstözött „sötét” piramidális idegsejtek a temporális *cortex* területén az *arteria cerebri media* 1 órás elzárása után. Egy órás *arteria cerebri media* elzárás után azonnal perfundált (a), 1 órát (b és c), 1 napot (d) vagy 2 napot (e) túlélő állatok fénymikroszkópos szövettani képei. A római számok az érintett kérgi réteget jelenti.



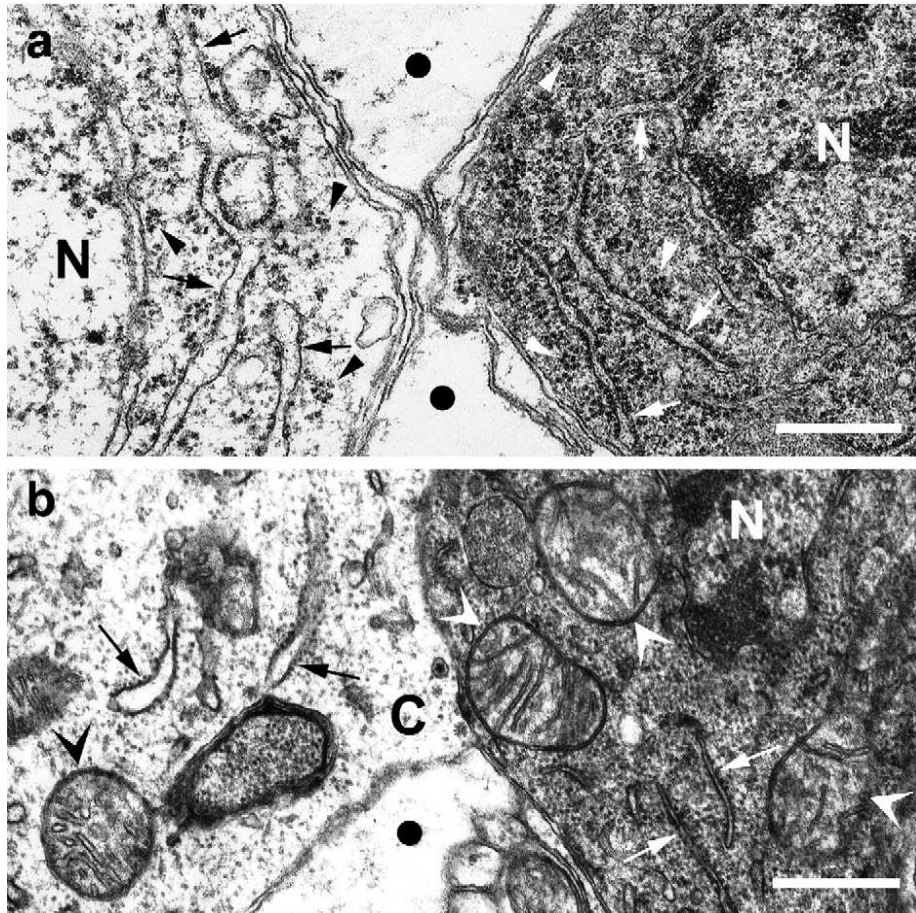
**20.ábra** Toluidin-kékkel jelölt „sötét” piramidális idegsejtek a temporális kéreg területén (a–d), emelkedett fázis-kontraszt a *caudo putamen* nekrotikus területein (e), TUNEL-jelölt sejtmagok a nekrotikus terület széli területén (f). Egy órás *arteria cerebri media* elzárás után azonnal perfundált (a), 1 órát (b és e), 1 napot (c és f) valamint 6 napot (d) túlélő állatok fénymikroszkópos képei.

### 6.3.2. Elektronmikroszkópos megfigyelések

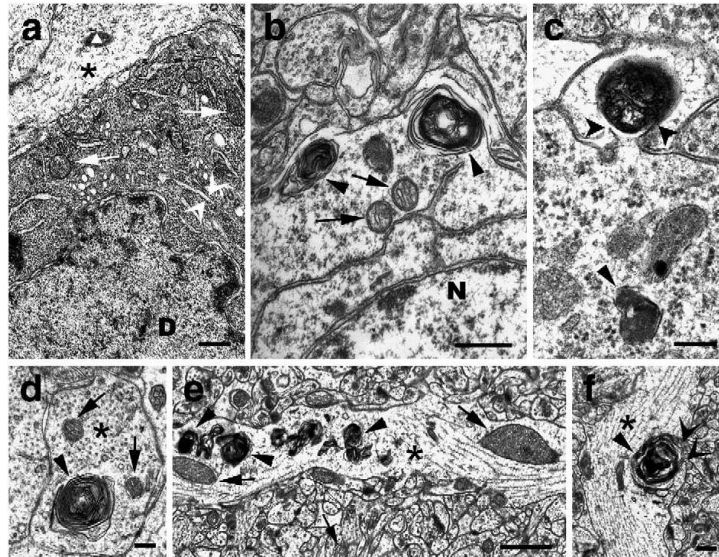
A filament eltávolítása után azonnal perfundált állatoknál néhány „kompaktálódott” idegsejt volt megfigyelhető (20. ábra a). Ezekben az ultrastrukturális elemek közötti távolságok drámai mértékben lecsökkentek, az ER ciszternái összeszűkültek, míg a Golgi-apparátus ciszternái kitágultak, a mitokondriumok mérete változatlan maradt, az ER-ciszternákhoz nem-kötődött riboszómák egymáshozkapcsolódott formában (poliriboszóma) voltak jelen. A sejtmag számos kisméretű kromatin-göböt tartalmazott. Egy órás túlélés esetében sok kompaktálódott idegsejt volt megfigyelhető. Ellentétben az azonnal perfundált állatokkal, a riboszómák egymáshoz nem-kötődött (sequestered) formában voltak jelen, és több, feltűnően nagy mitokondriumot tartalmaztak (21. ábra b) a megnövekedett fázis-kontrasztú terület közelében.

Egyill. 4 óra túlélés után a kompaktálódott idegsejtekben az ER ciszternái már normális méretűvé alakultak vissza (22. ábra a). Egy- ill. 2-napos túlélés után számos normális kinézetű idegsejt szómája és dendritjei mitokondrium-méretű membránörvényt (whorl) tartalmazott (22. ábra b,d,e). Ezek közül néhány a szómát vagy a dendritet éppen elhagyni látszott (22. ábra c,f). Ugyanezen a területen néhány "sötét" idegsejt olyannyira kompaktálódott, hogy a különböző ultrastrukturális elemeket többé nem lehetett elkülöníteni egymástól és emellett sok, különböző méretű membránkitüremkedést is tartalmazott. Mellettük glikogén szemcséket tartalmazó, duzzadt asztrociták voltak megfigyelhetők. Két napos túlélés esetén a korábbi membránkitüremkedések membránba csomagolt, kompakt és homogén fragmentumokká alakultak át (23. ábra a), amelyeket a 6-napot túlélő állatokban asztrociták, vagy mikroglia sejtek részben, vagy egészben fagocitáltak (23. ábra b,c). Az 1 napot túlélő állatokban a nekrotikus vagy excitotoxikus területeken néhány "sötét" idegsejt még kompaktabbá és elektrondenzebbé vált, míg mások megduzzadtak, sőt - részben, vagy egészben – „szétzilálódtak” (24. ábra a–d). Ezen utóbbi sejtek duzzadt dendritekkel és glikogén szemcséket nem tartalmazó asztrocitákkal voltak körülvéve (24. ábra a, d). Két ill. 6 nap elteltével a "sötét" idegsejtek a nekrotikushoz-hasonló feldarabolódáson mentek keresztül (24. ábra e, f). A nekrotikus területek szélén lévő, kompaktálódott-ultrastrukturájú sejtekben - az 1-napot túlélő állatoknál - a sejtmagok néhány kerekded (apoptotikus) kromatin-göböt tartalmaztak (25. ábra a, b). A 2 vagy több napot túlélő patkányokban az ilyen sejtek közül néhány a nekrotikushoz-hasonló fragmentálódáson mentek keresztül (25. ábra c), míg mások membránnal burkolt,

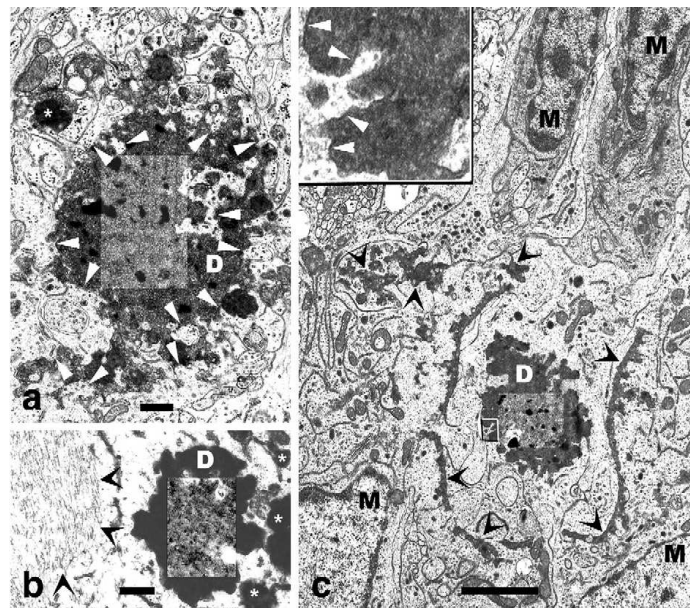
kompakt és homogén fragmentumokká estek szét, amelyeket glikogén-tartalmú asztrocita nyúlványok vettek körül. Ezeket mikroglia- vagy asztrocita-sejtek fagocitálták (25. ábra d, e).



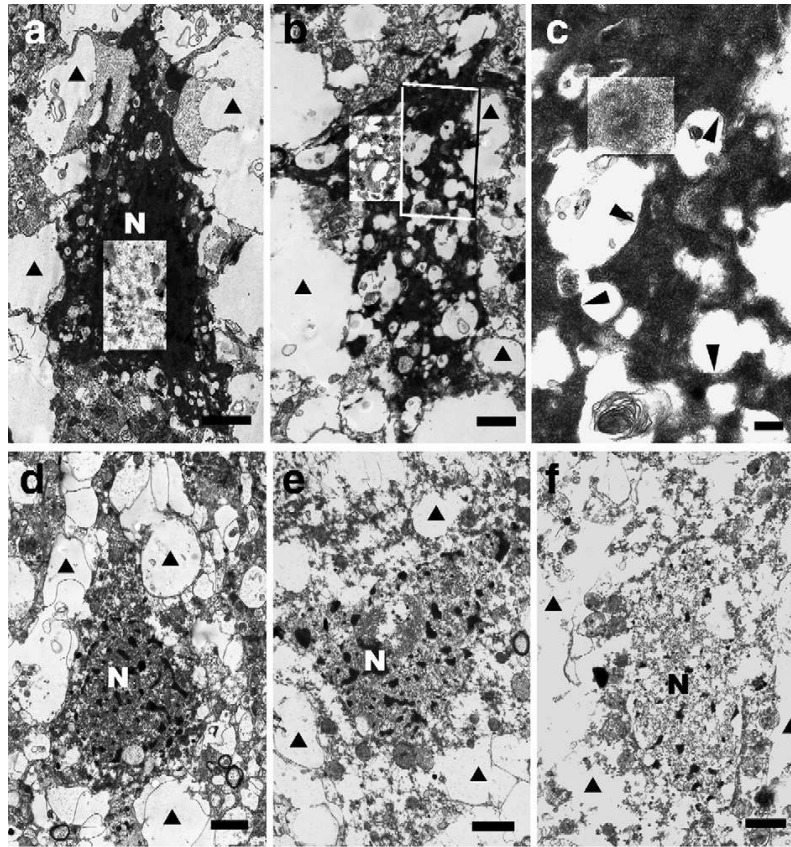
**21.ábra:** Újonnan képződött kompaktálódott „sötét” és nem kompaktálódott idegsejtek elektronmikroszkópos képei a *caudo putamen*-ben azonnali perfúzió (a) illetve 1 óras túlélés után az *arteria cerebri media* elzárása után.



**22.ábra:** Regenerálódó „sötét” idegsejtek szómája és dendritjei a temporális *cortex*-ben (a, b és f) valamint a *caudo putamen*-ben (c–e) 1órás (a), 1 napos (b, d és e) illetve 2 napos (c és f) túlélés esetében.

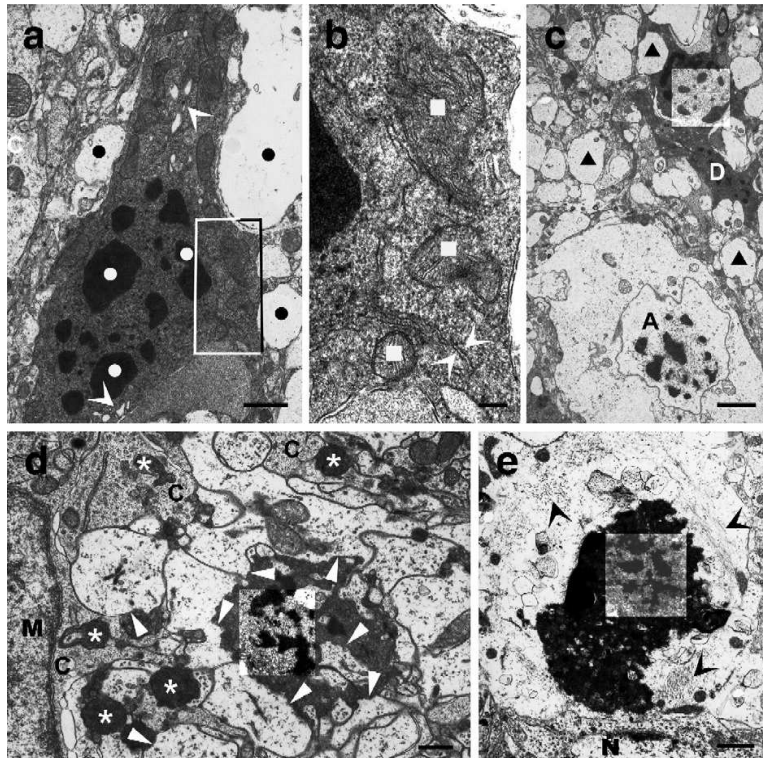


**23.ábra** A különböző apoptotikus úton valóeltávolítódás ép szöveti környezetben a *caudo putamen* (a és b) valamint a *neocortex* (c) területén 2 napos (a) illetve 6 napos (b and c) túlélés esetében.



**24.ábra** A temporális *cortex* területén lévő „sötét” idegsejtek nekrotikushoz hasonló eltávolítódásának különböző fázisai excitotoxikus szöveti környezetben. Egy órás (a), 1 napos (b–d) illetve 2 napos(e és f) túlélés esetében.





**25.ábra** Újonnan képződött apoptotikus idegsejt (a és b), apoptotikus idegsejt nekrotikushoz hasonló eltávolítódása a *caudo putamen* nekrotikus szöveti környezetben (c), illetve apoptotikushoz hasonló eltávolítódása a nekrotikus terület széli részén (d és e). Egy napos túlélés (a és b), illetve 2 napos túlélés (c–e) esetében.

#### 6.4. Megbeszélés, következtetések

Az iszkémia a keringés elzáródását jelenti. Ez az általunk alkalmazott fokális tranzienis iszkémia esetében csak részben valósul meg, mert a *caudo putamenben* a nekrotikus terület centrális illetve perifériás részén, valamint a temporális *cortex* citotoxikus illetve viszonylag ép szomszédos részén más-más mértékben csökken az áramló vér mennyisége [89]. Ezért az a biokémiai kaszkád, amely az ultrastrukturális kompaktiót előidézi, nagyban különbözhet ezeken a területeken. Ennek ellenére az alapvető morfológiai tulajdonságok minden újonnan-képződött „sötét” idegsejtben - úgy a *caudo putamen* stellatum sejtjeiben, mind a temporális *cortex* piramis sejtjeiben - megegyeztek. Megegyeztek továbbá az egyéb noxák (mechanikus, elektromos, hipoglikémiás) által okozott „sötét” idegsejtek morfológiai képével. Mindebből arra következtethetünk, hogy a „sötét” idegsejtek képződése egy iniciáló és egy végrehajtó fázisból áll. Az iniciáció mechanizmusa sokféle lehet, míg a végrehajtás mechanizmusa független az iniciáló noxa milyenségétől, továbbá az érintett idegsejtek feno- ill. kemo-



tipusától. Ez a tény megerősíti a „sötét” idegsejtek képződési mechanizmusával kapcsolatos korábbi elképzelésünket.

A koponyatrauma és az elektromos sokk [35], továbbá a hipoglikémia [56] hatására kompaktálódott („sötét”) idegsejtek egy hányada regenerálódik. Ennek fénymikroszkópos jele az ezüstöződés szemcséssé válása, majd eltűnése; kezdeti fázisának elektronmikroszkópos jele az, hogy az ER ciszternák visszanyerik eredeti térfogatukat, majd az egyéb ultrastrukturális elemek közötti távolság fokozatosan normalizálódik, közben pusztuló mitokondriumokból membrán-örvények keletkeznek, amelyek egy-két nap múlva elhagyják az idegsejteket. A különféleképpen előidézett „sötét” idegsejtek sejtbiológiai azonosságára vonatkozó elképzelésünket alátámasztja az a tény, hogy esetünkben ugyanezeket a regenerációra-utaló morfológiai elváltozásokat tapasztaltuk.

A koponyatrauma és az elektromos sokk továbbá a hipoglikémia hatására kompaktálódott („sötét”) idegsejtek egy másik hányada elpusztul. A nem-nekrotikus, nem-excitotoxikus illetve nem-kontúziós agyi területeken ezen noxák hatására kompaktálódott idegsejtek pusztuló hányada az apoptotikus sejtekéhez hasonló módon (homogenizáció, felszín-konvolúció, fragmentáció majd fagocitózis) távolítódik el az agyszövetből, amint ezt esetünkben is tapasztaltuk. Ebből arra következtethetünk, hogy a „sötét” idegsejtek nem nekrozis útján pusztulnak el, amint ezt korábban gondolták azon az alapon, hogy a nekrotikus, a citotoxikus illetve a kontúziós agyi területeken a „sötét idegsejtek a nekrotikus idegsejtekéhez hasonló módon (duzzadás, diszintegráció, diszperzió) távolítódnak el az agyszövetből. Minthogy az említett fizikai noxák esetén az ultrastrukturális kompaktáció pillanatszerű, az apoptotikus pusztulási mód is elképzelhetetlen. Így a „sötét” idegsejteknek saját pusztulási mechanizmussal kell rendelkezniük.

Esetünkben a nekrotikus környezetbe került apoptotikus idegsejtek is a nekrotikushoz hasonló módon távolítottak el az agyszövetből; apoptotikus eredetükre csak a visszamaradt nagy kromatin-göbök utaltak. Azaz a nekrotikus környezet rákényszerített egy nekrotikus eltávolítási mechanizmust az apoptotikusan elpusztult idegsejtekre. Ennek analógiájára feltételezzük, hogy a nekrotikus környezet a nem-apoptotikus és nem-nekrotikus (saját) mechanizmussal pusztuló „sötét” idegsejtekre is rákényszerít egy nekrotikus eltávolítási mechanizmust.

## 7. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### 7.1.

A közepsúlyos centrális folyadék perkussziós (CFP) modellel végzett kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a CFP után 30 perccel i.c.v.-beadott 100 µg PACAP szignifikánsan csökkenti mind az APP, mind az RMO-14 immunopozitív axonok denzitását, azaz a PACAP-nak neuroprotektív hatása van a TAI mindkét megjelenési formája, az axonduzzadás/ballonképződés és az ultrastrukturális kompakció esetében.

A PACAP neuroprotektív hatása nem volt szignifikáns a mediális hosszanti kötegben. Magyarán szólva szolgálhat az, hogy ezen idegpálya területén az ép axonok átmérője és lefutása más, mint a kortikospinális pálya területén, ahol a protektív hatás szignifikánsnak bizonyult.

Eredményeink alátámasztják a TAI impakt accelerációs modellje esetében tapasztaltakat, miszerint a PACAP hatékonyan csökkenti a maradandóan károsodott axonok számát a koponyatrauma következtében kialakuló intraaxonális transzportzavar és a neurofilament kompakció esetében.

### 7.2.

A Marmarou-féle impakt accelerációs modellel végzett kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a koponyatrauma után azonnal, vagy 30 perccel később i.c.v.-beadott 100 µg L-2286 (egy újonnan kifejlesztett PARP-gátló) szignifikánsan csökkenti mind az APP, mind az RMO-14 immunopozitív axonok denzitását, mind a CSpT-ben mind pedig az MLF-ben; azaz az L-2286-nak neuroprotektív hatása van a TAI mindkét megjelenési formája, az axonduzzadás/ballonképződés és az ultrastrukturális kompakció esetében.

Az APP-immunopozitív és RMO-14-immunopozitív axonok denzitásának az i.c.v.-beadott 100 µg L-2286 hatására való csökkenése eltérő mértékű volt. Ez a tény arra utal, hogy a szóban-forgó axon-károsodások heterogén jelenségek, különböző tengely-fonatokban különböző valószínűséggel „aktiválódnak”.

Az i.c.v.-beadott 100µg L-2286 neuroprotektív hatása a magatartásvizsgálatok során is bizonyítást nyert. Nevezetesen: a „beam-balance” teszt esetében szignifikánsan javította a károsodott motoros funkciókat, valamint az emelt-kersztpalló tesztben szignifikánsan csökkentette a trauma után gyakran fellépő szorongás mértékét.

### 7.3.

Az általunk alkalmazott fokális tranziens iszkémia esetében a sötét idegsejtek képződésére és morfológiai sajátosságaira vonatkozó új megfigyelésről tettünk.

Mindkét vizsgált agyterületen (*caudo putamen* centrális illetve perifériás része, valamint a temporális *cortex* citotoxikus illetve viszonylag ép szomszédos része) a más-más mértékben csökkenő vérátáramlás ellenére az alapvető morfológiai tulajdonságok minden újonnan képződött „sötét” idegsejtben azonosak voltak. Meggyeztek továbbá az egyéb káros behatások (mechanikus, elektromos, hipoglikémiás noxa) által okozott „sötét” idegsejtek morfológiai képével.

Mindebből arra következtethetünk, hogy a „sötét” idegsejtek képződése egy iniciáló és egy végrehajtó fázisból áll. Az iniciáció mechanizmusa sokféle lehet, míg a végrehajtás mechanizmusa független az iniciáló noxa milyenségétől, továbbá az érintett idegsejtek fenó- ill. kemo-típusától. Ez a tény megerősíti a „sötét” idegsejtek képződési mechanizmusával kapcsolatos korábbi elképzelésünket.

## 8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ PUBLIKÁCIÓK

1. **Kövesdi, E.**; Tamás, A.; Reglődi, D.; Farkas, O.; Pál, J.; Bukovics, P.; Dóczi, T.; Büki, A. Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats. *Neurotox. Res.* 2008, Apr;13(2):71-8 **If.: 2,828**

2. **Kövesdi, E.**; Bukovics, P.; Besson, V.C.; Pál, J.; Nyirádi, J.; Lückl, J.; Sümegi, B.; Dóczi, T.; Hernádi, I. and Büki, A. A Novel PARP Inhibitor L-2286 in a Rat Model of Impact Acceleration Head Injury: An Immunohistochemical and Behavioral Study. *Int J Mol Sci.* 2010 Mar 26;11(4):1253-68. **If.: 1,387**

3. **Kövesdi E.,** Pál J., Gallyas F. The fate of „dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects. *Brain Res.* 2007 May 25;1147:272-83. **If.: 2,296**

**Összesített impakt faktor: 6,511**

## 9. EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. 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 Ideggyogy Sz. 2007 Jul 30;60(7-8):284-94.

2. **E. Kövesdi**, E. Czeiter, A. Tamas, D. Reglodi, D. Szellar, J. Pal, T. Doczi and A. Buki Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful? Prog Brain Res. 2007;161:81-95. Review. **If.: 2,014**

3. Czeiter E, Pal J, **Kövesdi E**, Bukovics P, Luckl J, Doczi T, Buki A. Traumatic axonal injury in the spinal cord avoked by traumatic brain injury J Neurotrauma. 2008 Mar;25(3):205-13. **If.: 3,528**

4. **Kövesdi E**, Lückl J, Bukovics P, Farkas F, 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 Acta Neurochir (Wien). 2010 Jan;152(1):1-17 Review **If.: 1,472**

5. Czeiter E, Büki A, Bukovics P, Farkas O, Pál J, **Kövesdi E**, Dóczi T, Sándor J.: Calpain inhibition reduces axolemmal leakage in traumatic axonal injury. Molecules. 2009 Dec 9;14(12):5115-23. **If.: 1,738**

**Összesített impakt faktor: 15,263**

## KÖNYVFEJEZET

Büki A, **Kövesdi E**, Pál J, Czeiter E.: Clinical and model research of neurotrauma Methods Mol Biol. 2009;566:41-55

## KONFERENCIA RÉSZVÉTEL

1. J Pál, L. Kellényi, **E. Kövesdi**, J. Lückl, E. Ezer, F. Gallyas, A. Büki, T. Dóczi: Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. MIT 17th Congress, 3rd Pannonian Symposium on CNS Injury, Pécs, Hungary, 2005
2. János Lückl, József Pál, **Erzsébet Kövesdi**, Tamás Dóczi, John T. Povlishock, András Büki: Diffuse axonal injury in the spinal cord in various models of TBI. 23rd Annual Symposium of the National Society, Washington DC, 2005
3. Pal, J.; Kellenyi, L.; **Kovesdi, E.**; Luckl, J.; Ezer, E.; Gallyas, F.; Buki, A.; Doczi, T. Rodent model of multiparametric intracranial pressure monitoring. 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Netherland, 2006.
4. **Kovesdi, E.**; Tamas, A.; Reglodi, D.; Pal, J.; Bukovics, P.; Buki, A.; Doczi, T. Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats. 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Netherland, 2006.
5. **Kövesdi, E.**; Bohner, K.; Bukovics, P.; Farkas, O.; Uzsoki, B.; Czeiter, E.; Alföldi, V.; Kovács, N.; Dóczi, T. ,Hernádi, I.; Büki, A. Behavioral monitoring after different severity of traumatic brain injury using a rat model of impact acceleration. MITT XI. Kongress, Szeged, Hungary, 2007
6. **Kövesdi, E.**; Czeiter, E.; Bukovics, P; Farkas, O.; Polgár, B.; Szekeres-Barthó, J.; Dóczi, T. ; Büki, A. Comparative analysis of S100B protein in the cerebrospinal fluid in severe traumatic brain injury patients –case report. MITT XI. Kongress, Szeged, Hungary, 2007
7. E. Czeiter, J. Pal, **E. Kovesdi**, P. Bukovics, J. Luckl, T. Doczi, J. T. Povlishock, A. Buki Diffuse axonal injury in the spinal cord evoked by traumatic brain injury. 12th

EMN Annual Meeting Euroacademia Multidisciplinaria Neurotraumatologica, Roma Italy, 2007

8. **Kövesdi, E.**; Tamás, A.; Reglódi, D.; Farkas, O.; Pál, J.; Bukovics, P.; Dóczi, T.; Büki, A. Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats III. Neurotoxicity Society Meeting, Pucon, Chile, 2007 marc. 23-29.

9. **Erzsébet Kövesdi**, József Pál, Péter Bukovics, Ferenc Gallyas The fate of „dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects. A Magyar Stroke Társaság VIII. Konferenciája, Budapest, 2007. máj. 24-26, Hungary

10. **Kovesdi E**, Tamas A, Reglodi D, Bukovics P, Toth G, Doczi T, Hernadi I, Buki A. Behavioral aspects of posttraumatic administration of PACAP using a rat model of impact acceleration head injury. 8th Symposium on VIP, PACAP, and Related Peptides, Manchester and Burlington, Vermont, USA, Sept 3-8, 2007.

11. **Kövesdi E**, Besson, V.C., Bukovics, P, Nyirádi, J, Lückl, J, Pál, J, Hideg, Dóczi, T, Hernádi, I, Büki, A. A novel PARP-inhibitor L-2286 in a rat model of impact acceleration head injury: immunohistochemical and behavioral study. 5th Pannonian Symposium on CNS Injury, Pécs, Hungary, 2010

## 10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom első sorban programvezetőmnek *Dr. Gallyas Ferenc* professzor úrnak, és témavezetőmnek *Dr. Büki Andrásnak*, akik felkeltették a különböző jellegű koponyasérülések patomechanizmusának kísérletes vizsgálata és azok lehetséges kezelési módjai iránti érdeklődésemet, valamint nagyban elősegítették tudományos fejlődésemet a neurobiológia területén. Türelmükkel, kiváló szakértelmükkel és útmutatásukkal nagyban elősegítették vizsgálataim sikeres kivitelezését és PhD disszertációm sikeres előkészítését.

Köszönettel tartozom *Dr. Seress László* professzor úrnak, aki lehetővé tette kísérleteim komplettálásához az elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzését, *Andok Csabáné Mártinának* az elektronmikroszkópos szövettani minták elkészítéséért és *Nádor Andrásné Katinak*, az elektronmikroszkópos képek digitalizálásáért.

Köszönettel és hálával tartozom *Dr. Reglődi Dórának* és *Dr. Tamás Andreának* kiváló szakmai segítségükért és baráti támogatásukért a farmakológiai vizsgálatok kivitelezésében és tudományos közleményeim lektorálásáért.

Hálámat szeretném kifejezni *Dr. Hernádi Istvánnak* a magatartásvizsgálatokhoz nyújtott nagyfokú szakmai segítségéért és, hogy rendelkezésemre bocsátotta a PTE-TTK Általános Állatani és Neurobiológiai Tanszékén lévő eszközöket a magatartásvizsgálatok lebonyolításához, valamint *Molnár Dóra* asszisztensnek, *Bohner Katalinnak* és *Uzsoki Boglárkának* az állatok kezelésében és a vizsgálatokban nyújtott nagyfokú és precíz gyakorlati segítségért.

Külön köszönet jár *Nyírádi Józsefnek*, aki bevezetett a szövettani vizsgálatok rejtelmeibe és szépségeibe, és a baráti támogatásáért a laborban töltött éveim alatt, valamint *Dr. Czeiter Endrének*, *Dr. Ágoston Dénesnek*, *Dr. Lückl Jánosnak*, *Dr. Pál Józsefnek*, *Dr. Farkas Orsolyának*, hogy szakszerű szakmai tanácsaikkal és baráti támogatásukkal elősegítették kísérleteim kivitelezését, továbbá, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom *Dr. Bukovics Péternek* a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért.



## 11. IRODALOMJEGYZÉK

1. (2001) Surgical management of penetrating brain injury. *J Trauma* 51:S16-S25
2. Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabo C, Endres M (2001) Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 7:255-260
3. Adams JH (1982) Diffuse axonal injury in non-missile head injury. *Injury* 13:444-445
4. Agardh C-D, Kalimo H, Ollson Y, Siesjö BK (1981) Reply to remarks by J.B. Brierley and A.W. Brown. *Acta Neuropathol* 55:323-325
5. Alves O, Tolias CM, Lewis C, Hayes RL, Choi SC, Gilman C, Enriquez P, Povlishock JT, Bullock MR (2004) Brain Neurochemical Alterations in Patients with Severe Brain Injury Treated with Cyclosporin-A. A Placebo-Controlled Study. Preliminary Report. p 1125.-1125
6. Annaka M, Tannaka T (1992) Multiple phases of polymer gels. *Nature* 355:430-432
7. Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 48:301-331
8. Atlasz T, Babai N, Kiss P, Reglodi D, Tamas A, Szabadfi K, Toth G, Hegyi O, Lubics A, Gabriel R (2007) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 153:108-114
9. Attilo A, Söderfelt B, Kalimo H, Ollson Y, Siesjö B (1983) Pathogenesis of brain lesions caused by experimental epilepsy. Light and electron-microscopic changes in the rat hippocampus following bicuculline-induced status epilepticus. *Acta Neuropathol* 59:11-24
10. Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol* 67:25-36
11. Babai N, Atlasz T, Tamas A, Reglodi D, Toth G, Kiss P, Gabriel R (2005) Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox Res* 8:227-233
12. Balentine JD (1978) Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest* 39:236-253

13. Banks WA, Kastin AJ, Arimura A (1998) Effect of spinal cord injury on the permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to the neurotrophin PACAP. *Exp Neurol* 151:116-123
14. Barr RM, Gean AD, Lee TH (2006) Craniofacial Trauma. In: Brant WEaHCA (ed) *Fundamentals of Diagnostic Radiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,
15. Berg J, Tagliaferri F, Servadei F (2005) Cost of trauma in Europe. *Eur J Neurol* 12 Suppl 1:85-90
16. Besson VC, Croci N, Boulu RG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C (2003) Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat. *Brain Res* 989:58-66
17. Besson VC, Zsengeller Z, Plotkine M, Szabo C, Marchand-Verrecchia C (2005) 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
18. Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ (1994) Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 344:1055-1056
19. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) 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
20. Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, Dietrich WD (1997) 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
21. Bruns J, Jr., Hauser WA (2003) The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 44 Suppl 10:2-10
22. Buki A, Farkas O, Doczi T, Povlishock JT (2003) Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 attenuates traumatically induced axonal injury. *J Neurotrauma* 20:261-268
23. Buki A, Koizumi H, Povlishock JT (1999) Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp Neurol* 159:319-328
24. Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT (1999) Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 16:511-521
25. Buki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT (2000) Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 20:2825-2834

26. Buki A, Siman R, Trojanowski JQ, Povlishock JT (1999) The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:365-375
27. Burkle A (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays* 23:795-806
28. Cammermeyer J (1960) The post-mortem origin and mechanism of neuronal hyperchromatosis and nuclear pyknosis. *Exp Neurol* 2:379-405
29. Cammermeyer J (1961) The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* 245-270
30. Carty H, Pierce A (2002) Non-accidental injury: a retrospective analysis of a large cohort. *Eur Radiol* 12:2919-2925
31. Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, Chang T, Fricke ST, Faden AI (2004) The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis* 17:29-43
32. Christman CW, Grady MS, Walker SA, Holloway KL, Povlishock JT (1994) Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *J Neurotrauma* 11:173-186
33. Clifton GL, Jiang JY, Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ, Hayes RL (1991) Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:114-121
34. Cosi C, Colpaert F, Koek W, Degryse A, Marien M (1996) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice. *Brain Res* 729:264-269
35. Csordas A, Mazlo M, Gallyas F (2003) Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* 106:37-49
36. Czurko A, Nishino H (1993) 'Collapsed' (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 162:71-74
37. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 ( Pt 2):249-268
38. Davis GG, Glass JM (2001) Case report of sudden death after a blow to the back of the neck. *Am J Forensic Med Pathol* 22:13-18
39. Decker P, Isenberg D, Muller S (2000) Inhibition of caspase-3-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* 275:9043-9046

40. Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 73:155-164
41. Diakowski W, Sikorski AF (1995) Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids. *Biochemistry* 34:13252-13258
42. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67:110-119
43. Du L, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC, Graham SH, Carcillo JA, Szabo C, Clark RS (2003) Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 278:18426-18433
44. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57:1835-1840
45. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3:1089-1095
46. Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA (1997) Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1143-1151
47. Erb DE, Povlishock JT (1988) Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat. *Acta Neuropathol* 76:347-358
48. Farkas O, Polgar B, Szekeres-Bartho J, Doczi T, Povlishock JT, Buki A (2005) Spectrin breakdown products in the cerebrospinal fluid in severe head injury--preliminary observations. *Acta Neurochir (Wien)* 147:855-861
49. Farkas O, Tamas A, Zsombok A, Reglodi D, Pal J, Buki A, Lengvari I, Povlishock JT, Doczi T (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept* 123:69-75
50. Finkelstein E, Corso P, Miller T (2006) *The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States*. Oxford University Press, New York (NY)
51. Fiskum G (2000) Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 17:843-855
52. Flesh M (1887) Über die Verschiedenheiten im chemischen Verhalten der Nervenzellen. *Mitt Natforsch Ges Bern* 1073-1082, 192-199.
53. Foda MA, Marmarou A (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80:301-313

54. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41-49
55. Gallyas F (2007) Novel cell-biological ideas deducible from morphological observations on "dark" neurons revisited. *Ideggyogy Sz* 60:212-222
56. Gallyas F, Csordas A, Schwarcz A, Mazlo M (2005) "Dark" (compacted) neurons may not die through the necrotic pathway. *Exp Brain Res* 160:473-486
57. Gallyas F, Farkas O, Mazlo M (2002) Traumatic compaction of the axonal cytoskeleton induces argyrophilia: histological and theoretical importance. *Acta Neuropathol* 103:36-42
58. Gallyas F, Farkas O, Mazlo M (2004) Gel-to-gel phase transition may occur in mammalian cells: Mechanism of formation of "dark" (compacted) neurons. *Biol Cell* 96:313-324
59. Gallyas F, Guldner FH, Zoltay G, Wolff JR (1990) Golgi-like demonstration of "dark" neurons with an argyrophil III method for experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* 79:620-628
60. Gallyas F, Kiglics V, BaracsKay P, Juhasz G, Czurko A (2008) The mode of death of epilepsy-induced "dark" neurons is neither necrosis nor apoptosis: an electron-microscopic study. *Brain Res* 1239:207-215
61. Gallyas F, Pal J, Farkas O, Doczi T (2006) The fate of axons subjected to traumatic ultrastructural (neurofilament) compaction: an electron-microscopic study. *Acta Neuropathol* 111:229-237
62. Gallyas F, Zoltay G, Balas I (1992) An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to contusing concussive head injury in the rat. *Acta Neuropathol* 83:394-401
63. Ganea D, Delgado M (2002) 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
64. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP (1982) Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 12:564-574
65. Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, Zagon IS, Barker JE, Bloom ML (1995) Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res Bull* 36:593-606
66. Grady MS, McLaughlin MR, Christman CW, Valadka AB, Fligner CL, Povlishock JT (1993) 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

67. Graeber MB, Moran LB (2002) Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol* 12:385-390
68. Graham DI (1996) Neuropathology of Head Injury. In: Narayan RKWJEaPJT (ed) *Neurotrauma*. McGraw-Hill, New York, pp 43-5
69. Griffin RJ, Pemberton LC, Rhodes D, Bleasdale C, Bowman K, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Newell DR, Porteous JK, . (1995) Novel potent inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Anticancer Drug Des* 10:507-514
70. Ha HC, Snyder SH (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol Dis* 7:225-239
71. Heath DL, Vink R (1995) Impact acceleration-induced severe diffuse axonal injury in rats: characterization of phosphate metabolism and neurologic outcome. *J Neurotrauma* 12:1027-1034
72. Hsu M, Sik A, Gallyas F, Horvath Z, Buzsaki G (1994) Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 743:121-139
73. Iwashita A, Yamazaki S, Mihara K, Hattori K, Yamamoto H, Ishida J, Matsuoka N, Mutoh S (2004) Neuroprotective effects of a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 2-[3-[4-(4-chlorophenyl)-1-piperazinyl] propyl]-4(3H)-quinazolinone (FR255595), in an in vitro model of cell death and in mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 309:1067-1078
74. Jafari SS, Nielson M, Graham DI, Maxwell WL (1998) Axonal cytoskeletal changes after nondisruptive axonal injury. II. Intermediate sized axons. *J Neurotrauma* 15:955-966
75. Jeggo PA (1998) DNA repair: PARP-another guardian angel? *Curr Biol* 8:R49-R51
76. Kalimo H, Olsson Y, Paljarvi L, Soderfeldt B (1982) Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 2 Suppl 1:S19-S22
77. Katahira M, Yone K, Arishima Y, Nagamine T, Komiya S, Iwata (2003) The neuroprotective effects of PACAP on spinal cord injury. p 49
78. Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM (2000) 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
79. King WJ, MacKay M, Sirnack A (2003) Shaken baby syndrome in Canada: clinical characteristics and outcomes of hospital cases. *CMAJ* 168:155-159
80. Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 57-69

81. Koizumi H, Povlishock JT (1998) Posttraumatic hypothermia in the treatment of axonal damage in an animal model of traumatic axonal injury. *J Neurosurg* 89:303-309
82. Koizumi J, Yoshiva Y, Nakazawa T, Ooneda (1986) Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be induced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8:1-8
83. Komjati K, Besson VC, Szabo C (2005) Poly (adp-ribose) polymerase inhibitors as potential therapeutic agents in stroke and neurotrauma. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:179-194
84. Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH, Hong JS (1999) Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 91:493-500
85. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM (2006) The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 21:375-378
86. LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, Li JH, Smith F, Bareyre FM, Snyder SH, Graham DI, McIntosh TK (2001) Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 18:369-376
87. Lee VM, Carden MJ, Schlaepfer WW, Trojanowski JQ (1987) 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
88. Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-598
89. Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568
90. Marmarou A, Foda MA, van den BW, Campbell J, Kita H, Demetriadou K (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300
91. Marmarou CR, Povlishock JT (2006) 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
92. Marmarou CR, Walker SA, Davis CL, Povlishock JT (2005) Quantitative analysis of the relationship between intra- axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22:1066-1080

93. Maxwell WL (1996) Histopathological changes at central nodes of Ranvier after stretch-injury. *Microsc Res Tech* 34:522-535
94. Maxwell WL, Irvine A, Graham, Adams JH, Gennarelli TA, Tipperman R, Sturatis M (1991) Focal axonal injury: the early axonal response to stretch. *J Neurocytol* 20:157-164
95. Maxwell WL, McCreath BJ, Graham DI, Gennarelli TA (1995) Cytochemical evidence for redistribution of membrane pump calcium-ATPase and ecto-Ca-ATPase activity, and calcium influx in myelinated nerve fibres of the optic nerve after stretch injury. *J Neurocytol* 24:925-942
96. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL (1997) A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *J Neurotrauma* 14:419-440
97. McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI (1987) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*-119
98. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574
99. Murray CJ, Lopez AD (1997) Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-1442
100. Nagayama T, Simon RP, Chen D, Henshall DC, Pei W, Stetler RA, Chen J (2000) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J Neurochem* 74:1636-1645
101. Nedergaard M, Diemer NH (1988) Experimental cerebral ischemia: barbiturate resistant increase in regional glucose utilization. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:763-766
102. Newcomb JK, Zhao X, Pike BR, Hayes RL (1999) Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. *Exp Neurol* 158:76-88
103. Newman GR, Jasani B (1998) Silver development in microscopy and bioanalysis: past and present. *J Pathol* 186:119-125
104. Okonkwo DO, Melon DE, Pellicane AJ, Mutlu LK, Rubin DG, Stone JR, Helm GA (2003) Dose-response of cyclosporin A in attenuating traumatic axonal injury in rat. *Neuroreport* 14:463-466
105. Okonkwo DO, Pettus EH, Moroi J, Povlishock JT (1998) Alteration of the neurofilament sidearm and its relation to neurofilament compaction occurring with traumatic axonal injury. *Brain Res* 784:1-6



106. Okonkwo DO, Povlishock JT (1999) 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
107. Pal J, Toth Z, Farkas O, Kellenyi L, Doczi T, Gallyas F (2006) Selective induction of ultrastructural (neurofilament) compaction in axons by means of a new head-injury apparatus. *J Neurosci Methods* 153:283-289
108. Palfi A, Toth A, Kulcsar G, Hanto K, Deres P, Bartha E, Halmosi R, Szabados E, Czopf L, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K (2005) The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 315:273-282
109. Peters LL, Birkenmeier CS, Bronson RT, White RA, Lux SE, Otto E, Bennett V, Higgins A, Barker JE (1991) Purkinje cell degeneration associated with erythroid ankyrin deficiency in nb/nb mice. *J Cell Biol* 114:1233-1241
110. Pettus EH, Christman CW, Giebel ML, Povlishock JT (1994) Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. *J Neurotrauma* 11:507-522
111. Pettus EH, Povlishock JT (1996) Characterization of a distinct set of intra-axonal ultrastructural changes associated with traumatically induced alteration in axolemmal permeability. *Brain Res* 722:1-11
112. Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C (1999) 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
113. Povlishock JT (1992) Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. *Brain Pathol* 2:1-12
114. Povlishock JT, Becker DP (1985) Fate of reactive axonal swellings induced by head injury. *Lab Invest* 52:540-552
115. Povlishock JT, Becker DP, Cheng CL, Vaughan GW (1983) Axonal change in minor head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 42:225-242
116. Povlishock JT, Buki A, Koizumi H, Stone J, Okonkwo DO (1999) 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
117. Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, Trojanowski JQ, Moroi J (1997) Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:347-359
118. Povlishock JT, Pettus EH (1996) Traumatically induced axonal damage: evidence for enduring changes in axolemmal permeability with associated cytoskeletal change. *Acta Neurochir Suppl* 66:81-86

119. Povlishock J, Tashjian (2002) Head Trauma: Basic, preclinical, and clinical directions. In: John Wiley and Sons Inc (ed) Traumatic axonal injury. New York, pp 281-301
120. Racz B, Gallyas F, Jr., Kiss P, Toth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Roth E, Tamas A, Lengvari I, Lubics A, Reglodi D (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 137:20-26
121. Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontai L, Zsombok A, Farkas O, Buki A, Doczi T, Lengvari I (2000) Recent results on the neuroprotective effects of PACAP in rat models of focal cerebral ischemia, Parkinson's disease and traumatic brain injury. p 317
122. Reglodi D, Lubics A, Kiss P, Lengvari I, Gaszner B, Toth G, Hegyi O, Tamas A (2006) Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 40:265-274
123. Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Szalontay L, Lengvari I (2004) 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
124. Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Kozicz T, Arimura A (2000) Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 31:1411-1417
125. Reglodi D, Tamas A, Somogyvari-Vigh A, Szanto Z, Kertes E, Lenard L, Arimura A, Lengvari I (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23:2227-2234
126. Rolli V, O'Farrell M, Menissier-de MJ, de MG (1997) Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochemistry* 36:12147-12154
127. Sandor J, Szucs M, Kiss I, Ember I, Csepregi G, Futo J, Vimlati L, Pal J, Buki A, Doczi T (2003) [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage]. *Ideggyogy Sz* 56:386-395
128. Satchell MA, Zhang X, Kochanek PM, Dixon CE, Jenkins LW, Melick J, Szabo C, Clark RS (2003) A dual role for poly-ADP-ribosylation in spatial memory acquisition after traumatic brain injury in mice involving NAD<sup>+</sup> depletion and ribosylation of 14-3-3gamma. *J Neurochem* 85:697-708
129. Scott GS, Jakeman LB, Stokes BT, Szabo C (1999) Peroxynitrite production and activation of poly (adenosine diphosphate-ribose) synthetase in spinal cord injury. *Ann Neurol* 45:120-124

130. Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S (1994) Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol* 88:433-439
131. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S (1994) Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:55-62
132. Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y (2006) Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann N Y Acad Sci* 1070:550-560
133. Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y, Arimura A (1998) PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 865:111-117
134. Sillesen H, Nedergaard M, Schroeder T, Buchardt Hansen HJ (1988) Middle cerebral artery occlusion in presence of low perfusion pressure increases infarct size in rats. *Neurol Res* 10:61-63
135. Siman R, Baudry M, Lynch G (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3572-3576
136. Soderfeldt B, Kalimo H, Ollson Y, Siesjö BK (1983) Histopathological changes in the rat brain during bicuculline-induced status epilepticus. *Adv Neurol* 34:169-175
137. Somogyvari-Vigh A, Reglodi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 10:2861-2889
138. Stone JR, Okonkwo DO, Dialo AO, Rubin DG, Mutlu LK, Povlishock JT, Helm GA (2004) Impaired axonal transport and altered axolemmal permeability occur in distinct populations of damaged axons following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 190:59-69
139. Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT (2000) Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. *Brain Res* 871:288-302
140. Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT (2001) Intra-axonal neurofilament compaction does not evoke local axonal swelling in all traumatically injured axons. *Exp Neurol* 172:320-331
141. Stone JR, Walker SA, Povlishock JT (1999) 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
142. Strich SJ (1956) Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 19:163-185

143. Strich SJ (1961) Shearing of nerve fibers as a cause of brain damage due to head injury: A pathological study of twenty cases. *Lancet* 2:443-448
144. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446
145. Tabuchi A, Funaji K, Nakatsubo J, Fukuchi M, Tsuchiya T, Tsuda M (2003) Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. *J Neurosci Res* 71:504-515
146. Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Reglodi D (2006) Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann N Y Acad Sci* 1070:570-574
147. Tamas A, Zsombok A, Farkas O, Reglodi D, Pal J, Buki A, Lengvari I, Povlishock JT, Doczi T (2006) Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* 23:686-695
148. Tanaka T, Annaka M, Ilmain F, Ishii K, Kokufuta E, Suzuki A, Tokita M (1992) Phase transitions of gels. pp 683-703
149. Teasdale G, Jennett B (1974) Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2:81-84
150. Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S, Banks WA (1996) Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* 736:280-286
151. van LG, Saelens X, van GM, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9:1031-1042
152. Vaudry D, Chen Y, Ravni A, Hamelink C, Elkahloun AG, Eiden LE (2002) Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J Neurochem* 83:1272-1284
153. Vaudry D, Cottet-Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2004) 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
154. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H (2000) 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

155. Vink R, O'Connor CA, Nimmo AJ, Heath DL (2003) Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 336:41-44
156. Wilkinson AE, Bridges LR, Sivaloganathan S (1999) Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 98:197-202
157. Yakovlev AG, Faden AI (2004) Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* 1:5-16
158. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263
159. Zagon IS, Higbee R, Riederer BM, Goodman SR (1986) Spectrin subtypes in mammalian brain: an immunoelectron microscopic study. *J Neurosci* 6:2977-2986
160. Zsombok A, Toth Z, Gallyas F (2005) Basophilia, acidophilia and argyrophilia of "dark" (compacted) neurons during their formation, recovery or death in an otherwise undamaged environment. *J Neurosci Methods* 142:145-152