

Hisztopatológiai és kísérletes terápiás vizsgálatok súlyos koponya- agysérülés kísérletes modelljeiben

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

„Felfedezni valamit annyit tesz, mint látni, amit mindenki lát, és közben arra gondolni, amire még senki.”

Szent-Györgyi Albert

I. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR

A koponyasérülés epidemiológiája

A fejlett ipari társadalmakban a 35 év alatti aktív, munkaképes populációt érintő vezető halálok a koponyasérülés okozta agyi károsodás (TBI). Míg a nyugati társadalmakban a koponyasérülés következtében létrejövő halálozás 20-25%-ot tesz ki, addig ez Magyarországon eléri a 45%-ot. Európában 1.600.000 koponyasérülést szenvedett beteg részesül kórházi ellátásban, az agysérült páciensek aránya évente 100.000 emberből 235 fő. Koponyasérülések legfőképpen autóbalesetek, elesés, erőszakos behatások és különböző sportágakból fakadó sérülések okozataként jönnek létre. A leginkább veszélyeztetett demográfiai csoport a férfiak és az egyedül élők hátrányos területeken.

A fejlett európai országokban a súlyos koponyasérültek kórházi ellátásának költsége páciensenként eléri a 6.000 Eurót, 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.

A baleseti agysérülések osztályozása

A sérülés súlyosságának meghatározására leggyakrabban használt módszer a Teasdale és mtsai. által kialakított Glasgow kóma skála (Glasgow coma scale, GCS), amelyben megkülönböztetnek: enyhe (GCS=13-15), középsúlyos (GCS=9-12), valamint súlyos (GCS=3-8) sérüléseket. A koponyasérülések klasszikus felosztása szerint megkülönböztetünk nyílt és zárt sérüléseket. 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 vagy az ép agyszövetben elszórtan előforduló módon.

Diffúz axonális károsodás

A diffúz axonális károsodás (DAI) a koponyatrauma hatására létrejövő axonális elváltozások összessége, melyek az ép axonok között elszórtan, többnyire ép parenchymális környezetben figyelhetők meg.

A DAI-nak két morfológiailag jól elkülöníthető megjelenési formája van: az axonduzzadás/axonballon-képződés (AD/B), valamint az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (NFC). A DAI vizsgálathoz különböző állatkíséletes modelleket alkalmaznak, de ezek nem képesek a humán DAI teljes kiterjedését és időbeni lefolyását 100%-ban utánozni. Ezért az állatkísérletekben modellezett axonkárosodást traumás axonkárosodásnak (TAI) nevezzük, a DAI elnevezést pedig a humán esetekre használjuk.

Axon duzzadás/axonballon képződés (AD/B)

A diffúz axonkárosodást jelenségét Strich és mtsai. írták le először. A súlyos koponyasérültek *post mortem* vizsgálata során a fehérállományban az ép axonok között elszórt ballonszerű axontágulatok láthatóak, amely tágulatoktól disztális axonszakaszon Waller-féle degeneráció és myelin-degradáció is megfigyelhető. A manapság használt elnevezés, azaz a DAI Adams-tól szárazik. Strich óta Adams és kollégái hangsúlyozták először, hogy az axonkárosodás a koponyasérülés elsődleges következménye, és nem pedig a másodlagos károsodás következtében alakul ki. Povlishock és mtsai. szerint ezen axonális károsodást a középsúlyos illetve a súlyos koponyatrauma által kiváltott nyíróerők indítják el. Megállapították, hogy a DAI a károsodott axonok nagy részében egy időben fokozatosan

előrehaladó folyamat. A folyamat során a károsodott axonszakaszokban a sérülést követően gyakorlatilag azonnal (<5 perc) fokális axolemmális permeabilitási zavar jelentkezik.

Az axolemma fokális sérülését olyan morfológiai jellemzők kísérik, mint a mitokondriumok megduzzadása, neurotubulusok eltűnése, neurofilament-módosulások és az előre irányuló axonális transzportzavar. Ez utóbbi következményeként a szállítódó sejtalkotók és egyéb anyagok felhalmozódnak, így létrejön az axonduzzadás. Idővel az axonduzzadás egyre nagyobb mértékű lesz, melynek végeredményeként az érintett axonszakasz ballon formájában lefűződik, létrehozva a kórkép korai leírásaiból ismert proximális axonballonokat, míg a disztális axonszakasz Waller-féle degenerációt szenved.

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.

Az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (NFC)

Az NFC-t Povlishock és mtsai. fedezték fel, koponyatrauma után szinte azonnal (5 perc) perfúziósan fixált állatok agytörzsének elektronmikroszkópos vizsgálatával. Megfigyelték, hogy a neurofilamentek közötti távolság mintegy felére csökkent, valamint nagymértékben csökkent a mikrotubulusok illetve a neurofilament oldalkarok száma. Elképzelésük szerint az NFC mechanizmusa a következő: koponyatrauma hatására az érintett axon egy rövid szakaszán makromolekulákat áteresztetni képes méretű pórusok nyílnak meg (mechanoporáció), megszűnik az axolemmának az ionháztartást szabályozó szerepe, az axonba kalcium ionok áramolnak be. A nagymértékben megnövekedett kalcium koncentráció következtében aktiválódik a calpain, amely a nem-erythroid alfa-II spektrin 145 kD és 150 kD méretű egységekre bontja (calpain-mediálta spektrin proteolízis, CMSP). A spektrin a szubaxolemmális citoszkeleton alkotórésze, továbbá megtalálható a mitokondriumok körül is. Bontása eleinte csak a szubaxolemmális tér és a mitokondriumok körül zajlik (15-30 perc), majd továtévődik az érintett axon citoszkeletális hálózatára, melynek emésztődése további permeabilitási zavart és további intraaxonális proteolitikus kaszkád aktiválódást eredményez, amely végül irreverzibilis axonkárosodását okoz.

Az NFC kimutatására a neurofilament közepes méretű alegysége (NF-M) elleni RMO-14 antitestet használják, amely a neurofilament-oldalkarok defoszforilálódása során szabaddá vált NF-M alegység „rod domén”-jéhez képes kötődni. Kezdeti elképzelések szerint a citoszkeletális elváltozások ugyanazokat az axonokat érintik, mint az AD/B. Újabb megfigyelések szerint az AD/B és a NFC az esetek többségében két különböző axonpopulációt érint, és csak kis részben figyelhető meg ugyanazon károsodott axonon belül, azaz egymástól független jelenségekről van szó.

A diffúz agysérülés kísérletes terápiás befolyásolása

Az agyalapi mirigy adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) alkalmazása

A DAI kórfolyamatában mind a nekrotikus mind az apoptotikus enzim-kaszkád szerepet játszik, ezért azok az eljárások, melyek feltehetően mindkettőt gátolják, kiemelt figyelmet érdemelnek. E kettős támadáspont különösen azért kap hangsúlyt, mert egyes elképzelések szerint az apoptotikus folyamatok gátlása az elektrontranszport-lánc disszociációja illetve a cytochrome c felszabadulása, azaz a mitokondriális károsodás létrejötte után már nem eredményezheti a neuron megmenekülését, csupán az apoptotikus sejthalál helyett a nekrotikus kaszkád aktiválódását, tehát a két enzimatikus folyamat közti „shiftet” idézi elő.

A PACAP szerkezetileg a vasoaktív intestinális peptid (VIP)/szekretin/glükagon családba tartozik, melyet először a hypothalamusból izoláltak.

In vitro mind antiapoptotikus, mind gyulladáscsökkentő hatásait leírták. *In vivo* vizsgálatok alapján igazolódott, hogy a PACAP átjut a vér-agy gáton és egyaránt hatásosnak bizonyult patkányban kísérletesen előidézett globális és fokális agyi iszkémia előtt, és után adva, valamint retinális degeneráció esetében is.

Az elmúlt években munkacsoportunk vizsgálta a PACAP neuroprotektív hatását diffúz károsodást okozó trauma modellben patkányon. A korábban agyi iszkémiában hatásos dózis (125µg, sérülés előtti intavénás (i.v.) kezelés) nem volt hatásos, ám az intracerebroventrikuláris (i.c.v.) kezelés hatásosnak bizonyult. A vizsgálatunkban használt dózis a fenti kutatási eredményeken alapul, miszerint az i.c.v. 100µg PACAP képes szignifikánsan csökkenteni a károsodott axonok denzitását a corticospinális pálya (CSpT) területén.

A poli(ADP-ribóz)polimeráz (PARP)-gátlás

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

Miközben a PARP hosszú távú gátlása elvileg mutagenezist és cancerogenezist indukálhat, az akut szakban hozzájárulhat az energia-háztartás rendeződéséhez, az energia-homeosztázis fenntartásához.

Komjáti és munkatársai a közelmúltban (2005) megállapították, hogy a PARP-gátlás nemcsak a szabadgyök-indukálta nekrozist gátolja. Az apoptózis indukáló faktoron (AIF) keresztül a PARP közvetlenül szerepet játszik az apoptotikus folyamatok elindításában is és az NF-kappaB-úton keresztül inflammatorikus cytokinek és mediátorok felszabadulását is modulálja.

Az elmúlt években a koponyasérülés különböző modelljeiben számos PARP-inhibitor tesztelték, így a PARP-inhibitor 3-aminobenzamide-ot, mely szignifikánsan csökkentette a hideg-indukálta agysérülés-modellben kialakuló lézió kiterjedését.

Érdekes ugyanakkor, hogy hasonlóan a calpain gátlás neuroprotektív hatásához, a PARP-inhibíció során sem sikerült eddig minden esetben feltárni a kedvező klinikai hatás patomorfológiai hátterét.

Kísérletünk során egy új fejlesztésű kinazolin származék PARP gátlót, az L-2286 (2-[(2-piperidin-1-yletil)thio]quinazolin-4(3H)-one) hatását vizsgáltuk Marmarou-féle impakt accelerációs modell okozta koponyasérülés esetében.

Diffúz idegsejt-károsodás („sötét” idegsejt képződés)

Több mint száz éve írták le, hogy különböző neurológiai betegségekben meghaltak agyában olyan idegsejtek találhatók, amelyek magja, citoplazmája és fő dendritjei nagymértékben zsugorodottak, valamint erősen kötik a neurohisztológiában használatos bázikus festékeket. Ezeket a sejteket tradicionálisan „sötét” idegsejteknek nevezik. A 80-as éve eleje óta számos neurológiai megbetegedés állatkísérletes modellje esetében is leírták „sötét” idegsejtek jelenlétét (hipoglikémia, hiperglikémia, epilepsziás roham, fokális iszkémia, négy-ér iszkémia).

Gallyas és mtsai a 90-es évek elején megfigyelték, hogy mind *in vivo*, mind *post mortem* mechanikai trauma hatására is képződnek „sötét” idegsejtek és axonok. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a „frissen” képződött „sötét” idegsejt ultrastrukturális elemei épnek tűntek, de szorosan egymás mellé tömörültek (ultrastrukturális

kompakció). Az érintett sejtek elektron-denzitása megemelkedett, térfogatuk a felére csökkent a plazma-membrán felszakadása nélkül. Az endoplazmatikus retikulum (ER) ciszternái összeszűkültek, a Golgi-ciszternák viszont kitágultak. Nem változott a mitokondriumok és a multivezikuláris testek térfogata. A „sötét” idegsejtekre jellemző: ha a szómája kompaktálódik, akkor dendritfája is, és fordítva. Az axonoknak mindig viszonylag hosszú szakaszai kompaktálódnak.

E jelenségek úgy magyarázhatók, hogy a kompaktálódás minden egyes szóma-dendrit domén, vagy axon egyetlen pontján indul meg, majd onnan terjed rá az egészre. Ezt a folyamatot Gallyas és mtsai. (1992) úgy magyarázták, hogy az idegsejtek (és más sejtek) citoplazmájában egy - az ultrastrukturális elemekhez „lehorgonyzott” - mikro-trabekuláris gélstruktúra található, amely nem-kovalens kötések formájában szabad energiát tárol, és képes egy ponton való iniciálás után, összehúzódással járó, tovaterjedő fázisátalakulásra (gélből-gél fázisátalakulás) a tárolt energia hatására. 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, status epilepticus vagy mechanikai behatás) által. A gél-struktúra összehúzódása magával vonja a hozzá horgonyzott ultrastrukturális elemeket, és folyadékot présel ki a szóma-dendrit doménből illetve az érintett axon-szakaszokból.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a diffúz axonális károsodás kísérletes terápiás befolyásolásának új lehetőségeit kívántam vizsgálni illetve az ultrasstrukturális kompaktálódás kialakulási mechanizmusának további részleteit szerettem volna pontosabban feltárni. A legfontosabb általam vizsgált kérdések az alábbiak voltak:

1., Van-e neuroprotektív hatása a PACAP-nak a centrális folyadék perkussziós (CFP) patkány-moddal végzett traumás agysérülés esetén?

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

3., Mi a sorsa a tranziens fokális agyi iszkémia okozta „sötét” (ultrastrukturális kompaktációt szenvedett) idegsejteknek nem-nekrotikus és nem-excitotoxikus szöveti környezetben?

1. PACAP KEZELÉS HATÁSA PATKÁNY FOLYADÉK PERKUSSIÓS KOPONYATRAUMA MODELL ESETÉBEN

1.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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.

A centrális folyadék perkussziós modell kivitelezése patkányon

Az állatokat 5 percig előaltattuk 4% isoflurán, 70% N₂O és 30% O₂ keverékével. Intubálás után a műtét alatt a patkányokat mélyen altattuk 1-2% isoflurán, 70% N₂O és 30% O₂ elegyével, altatógép segítségével. Ezután 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 occipitális 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 állatok a FP berendezésre helyezve közepsúlyos (2 atm) koponyatraumában részesültek. Az ál-műtött csoporton csak magát a műtétet végeztük el, de traumát nem kaptak. 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% O₂-t kaptak a légzés normalizálásáig.

I.c.v. PACAP kezelés

Egyszeri kezeléssel 100 µg PACAP-ot 5µl fiziológiás sóoldatban feloldva juttattunk a jobb oldali agykamrába 30 perccel a trauma (AP:-1,0; L: 1,5; V:-3,5 a bregmától számítva). A vivőanyag kezelt csoport ezzel megegyező módon fiziológiás sóoldatot kapott.

Immunhisztokémia

Trauma után 2 órával az állatokat intraperitoneális (i.p.) pentobarbituráttal túlaltattuk, majd szíven keresztül előbb fiziológiás sóoldattal és 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk őket. Az agyakat a gerincvelő agytörzsi szakaszával együtt eltávolítottuk a fixált állatokból és egy éjszakán keresztül 4%-os paraformaldehid oldatban tároltuk. Az agytörzsi részből egy mediális 5mm széles blokkot vágunk ki speciális agyfeldaraboló segítő eszközzel, majd vibratóm segítségével 30µm-es szeletekre vágjuk. Ezeket 0,1 M-os foszfát pufferben tároltuk az immunhisztokémiai protokoll megkezdéséig.

Kétféle immunhisztokémiai protokollt használtunk. Egyrészt a károsodott axonális transzport vizsgálatához a béta-amiloid prekursor protein (β-APP) C-terminusára ható poliklonális antitesttel immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. Másrészt a NFC vizsgálatára RMO-14 antitestet használtunk, amely a trauma következtében konformáció változáson átesett NF-M alegységén található „rod-domén”-hez kötődik.

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

Az APP illetve RMO-14 immunopozitív (IP) axonokat fénymikroszkóp, hozzákapcsolt digitális fényképezőgép, 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 (MLF) agytörzsi szakasza, ezért ezeket a területeket elemeztük.

Statisztikai analízis

A PACAP és a vehikulummal kezelt csoport közötti károsodott axonok denzitását (immunjelölt axon/mm²) Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

1.2. EREDMÉNYEK

Az eredmények fénymikroszkópos valamint statisztikai elemzése során megállapítottuk, hogy a középsúlyos CFP okozta koponyatrauma után 30 perccel történő i.c.v. 100 µg PACAP kezelés a vehikulummal kezelt állatokhoz viszonyítva szignifikánsan csökkentette mind az APP, mind az RMO-14 IP axonok denzitását a CSpT-ben. Az MLF-ben szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk sem az APP, sem az RMO-14 IP axonok denzitásában a PACAP és vehikulummal kezelt csoport között (**1. Táblázat**).

| APP IP axonok | <i>Vehikulum</i> | <i>PACAP</i> | RMO-14 IP axonok | <i>Vehikulum</i> | <i>PACAP</i> |
|----------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| <i>CSpT</i> | 560,96±64,36 | 290,04±36,93 (p<0,05) | <i>CSpT</i> | 283,31±29,91 | 155,71±31,52 (p<0,05) |
| <i>MLF</i> | 307±24,17 | 265,57±10,81 | <i>MLF</i> | 272,31±20,1 | 265,7±33,46 |

1. Táblázat APP és RMO-14 IP axonok denzitása a CSpT és az MLF területén a PACAP illetve vehikulum kezelt állatok esetében. Az adatok átlag denzitás/mm² ± SEM. p <0,05 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest.

1.3. MEGBESZELÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk az első olyan tanulmány, amely a CFP modellben bizonyította a PACAP neuroprotektív hatását TAI esetében. Megfigyeléseink alátámasztották azokat a korábbi tapasztalatokat, melyek szerint a diffúz TAI impakt accelerációs modellje esetében, a PACAP hatékony gátlószerként működik az axonális károsodás következtében létrejövő intraaxonális transzportzavar és NFC kivédésében. Továbbá jól egybevágtak azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyek a PACAP neuroprotektív hatását vizsgálták különböző *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok során. *In vitro* körülmények között a szer különböző sejtvonalakon végzett kísérletek során hatékony apoptózist gátló hatással rendelkezik. *In vivo* mind az átmeneti, mind a tartós fokális iszkémia állatkísérletes modellek esetében csökkentette az elhalt agy területének nagyságát. Teljes agyi iszkémia esetében az i.c.v. vagy i.v. PACAP kezelés gátolta az iszkémia okozta sejtpusztulást a hippocampus CA1 régiójának területén. A Parkinson-kór állatkísérletes modelljében a substantia nigra dopamintermelő sejtcsoportjait megvédte a programozott sejthaláltól. TAI esetében a PACAP szignifikánsan gátolta a

caspase aktivitást, valamint az apototikus kaszkád létrejöttében kulcsfontosságú szerepet játszó molekulák működését. A TAI létrejöttében fontos szerepet játszik az intraaxonális mitokondriumok integritásának megváltozása. A kóros mitokondriális kalcium akkumuláció inaktíválja a mitokondriális akonitáz enzim működését, és ezúton is befolyásolja az idegsejtek életképességét. A PACAP ezt az inaktivációt gátolva képes fenntartani a mitokondriális integritást.

A kísérlet fő megállapítása, hogy közepsúlyos CFP után 30 perccel történő i.c.v. 100µg PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette mind az APP, mind az RMO-14 IP axonok denzitását. Habár 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 pályarendszerben a károsodott axonok denzitása valamint az átmérőjük és lefutásuk más, mint ami a mediális hosszanti köteg területén lévő axonokra jellemző, de ez csak részben magyarázhatja az eredményekben tapasztalt eltérést.

Vizsgálatainkat összegezve, igazoltuk, 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.

2. L-2286: EGY ÚJ PARP INHIBITOR HATÁSA PATKÁNY IMPAKT ACCELERÁCIÓS MODELL ESETÉBEN

2.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A kísérleteket 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.

Marmarou-féle impakt accelerációs modell patkányon

Az állatokat először 5 percre előaltattuk 4% isoflurán, 70% N₂O és 30% O₂ keverékével, majd a műtét alatt mélyen altattuk 1,5 % isoflurán, 70% N₂O és 30% O₂ elegyével, altatógép segítségével. Intubálás után az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a fejtető bőrén ejtett hosszanti bemetszéssel feltártuk a koponya lambda és bregma varratok közötti részét. A lambda és bregma varratok közötti tér közepére, a középvonalba egy rozsdamentes fémkorongot (10 mm átmérőjű és 3 mm vastagságú) rögzítettünk, amivel kivédhető egy esetleges koponyatörés. A súlyos koponyasérülés létrehozása céljából két méter magasságból 450 g 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. Ha 20 mp-ig nem tért vissza a spontán légzés, akkor azonnal vissza lettek helyezve az altatógépre, ahol 100% O₂-t kaptak a légzés normalizálódásáig. Az ál-műtött állatokon ugyan ezt a műtéti eljárást alkalmaztuk, de traumában nem részesültek.

I.c.v. L-2286 dózis-hatás görbéjének megállapítása

Harminc perccel a trauma után egyszeri 10, 50 illetve 100 µg/patkány 5 µl fiziológiás sóoldatban feloldott L-2286-t juttatunk be a jobb oldali agykamrába kezeltünk (AP:-1,0; L: 1,5; V:-3,5; a bregmától számítva). A vivőanyag kezelt csoport ugyanakkora mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott a hatóanyaggal kezelt csoportokkal megegyező módon. Trauma után 2 órával ezeket az állatokat az „Immunhisztokémia”-részben ismertetett eljárásnak vetettük alá azzal a különbséggel, hogy csak az APP IP axonok denzitását határoztuk meg a CSpT agytörzsi szakaszában.

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

Az állatok egyik felét közvetlenül, a másik felét 30 perccel a trauma után az előbb ismertetett módon i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-tal kezeltünk. A két kezelési időpontnak megfelelően a vehikulum kezelt csoportot ezzel megegyező módon 5 µl/patkány fiziológiás sóoldattal kezeltük. Az immunhisztokémiai vizsgálathoz a trauma után 2 órával ezeket az állatokat is az „Immunhisztokémia”-részben ismertetett eljárásnak vetettük alá.

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

Az APP IP axonokat fénymikroszkóp, illetve hozzákapcsolt digitális fényképezőgép, valamint számítógépes képvizsgáló program segítségével (Image-Pro Plus v5.0.1) elemeztük.

Statisztikai analízis

Az L-2286 illetve vehikulum kezelt csoport közötti károsodott axonok denzitásbeli (átlag/mm²) különbségét mindkét vizsgálati időpontban Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

Beam-balance teszt

A műtét előtt 1 nappal az állatokat előedzettük, hogy képesek legyenek az egyensúlyukat megtartani 60 mp-ig egy 1,5 cm szélességű fából készült gerendán, amit 60cm magasságban helyeztünk el egy szivacspárna felett. Minden kísérleti csoportot a műtét után 1 órával és a műtétet követően 1-7 napig naponta egyszer teszteltük, majd az egyes csoportok napi eredményeit értékeltük. A teszt értékrendszere a következő: 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 eközben leesik, 5.: függ a gerendán, majd leesik, 6.: egyáltalán nem kísérli meg a fentmaradást a gerendán.

Open-field teszt

Az open-field tesztet a lokomotoros aktivitás vizsgálatára használtuk. Az eszköz egy 70x70 cm alapterületű és 50 cm magasságú láda. A trauma utáni nyolcadik napon az állatokat bevittük a kísérleti helyiségbe, ahol 30 percet töltöttek a saját ketrecükben (akklimatizáció), majd minden egyes állatot 5 perces időtartamra az open-field közepére helyeztünk. A „crossingok”, mosakodások és ágaskodások számát értékeltük az 5 perces vizsgálati időtartam alatt videokamera segítségével.

Emelt keresztpalló teszt

Az emelt keresztpalló teszt a szorongás vizsgálatára alkalmas. Négy egymásba nyíló karból áll, amelyből 2 kar teljesen nyitott (nyitott kar), viszont a másik 2 kar 3 oldala fallal

van körülvéve (zárt kar). Minden egyes állatot 5 perces időtartamra a berendezés közepére helyeztünk és a következő paramétereket vizsgáltuk az egyes csoportokban: fejbudugások 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-, az open-field és az emelt keresztállás teszt 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.

2.2. EREDMÉNYEK

Az i.c.v. L-2286 dózis-hatás görbéje

A trauma után 30 perccel történő i.c.v. 10 µg/patkány L-2286-al kezelés nem csökkentette az APP IP axonok denzitását a CSpT-ben. Az i.c.v. 50 µg-al történő kezelés csökkentette az APP IP axonok számát, de ez a vehikulummal kezelt állatok értékeihez képest statisztikailag még nem volt szignifikáns. A három vizsgált dózis közül csak az i.c.v. 100µg-al történő kezelés volt képes szignifikáns mértékben csökkenteni az APP IP axonok denzitását a CSpT-ben (**2. Táblázat**).

| | <i>Vehikulum</i> | <i>10 µg</i> | <i>50 µg</i> | <i>100 µg</i> |
|-----------------|------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| <i>Denzitás</i> | 345,61±41,56 | 348,09±13,08 | 255,58±10,72 | 87,61±8,86 ($p < 0,01$) |

2. Táblázat A trauma után 30 perccel történő különböző dózisú i.c.v. L-2286 kezelés hatása az APP IP axonok denzitására a CSpT területén. Az adatok átlag denzítás/mm² ± SEM. $p < 0,01$ a vehikulummal kezelt állatokhoz képest.

Terápiás ablak

Mind az APP, mind az RMO-14 IP axonok esetében, mind az azonnali, mind a trauma után 30 perccel történő i.c.v. 100µg/patkány L-2286 kezelés hasonló mértékben csökkentette a károsodott axonok denzitását mint a CSpT-, mind az MLF területén. Viszont az RMO-14 IP axonok esetében az azonnali kezelés hatásosabbnak tűnt, mivel szignifikáns különbség volt megfigyelhető mind a CSpT, mind az MLF területén a trauma után 30 perccel történő kezeléshez képest (**3. Táblázat**).

| APP IP axonok | <i>Vehikulum</i> | <i>L-2286 azonnali kezelés</i> | <i>L-2286 30 perccel a trauma után</i> |
|-------------------------|------------------|--------------------------------|--|
| <i>CSpT</i> | 345,61±41,56 | 72,50±8,54 (p<0,01) | 87,61±8,86 (p<0,01) |
| <i>MLF</i> | 285,33±48,90 | 45,59±4,09 (p<0,01) | 71,17±7,23 (p<0,01) |
| RMO-14 IP axonok | | | |
| <i>CSpT</i> | 88,29±6,55 | 5,56±2,98 (p<0,01) | 45,81±5,04 (p<0,01) |
| <i>MLF</i> | 131,66±21,39 | 16,01±3,04 (p<0,01) | 42,92±2,3 (p<0,01) |

3. Táblázat APP és RMO-14 IP axonok denzitása a CSpT és az MLF területén a vehikulum illetve i.c.v.100 µg/patkány L-2286-al azonnal valamint 30 perccel a trauma utáni kezelés esetében. Az adatok átlag denzitás/mm² ± SEM. p <0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest.

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

A négy vizsgált csoport közül a vivőanyagot kapott állatok mutatták a legrosszabb motoros teljesítményt. Ezek az állatok az utolsó vizsgálati napra sem érték el az ál-műtött állatok teljesítményét. A trauma után azonnal történő i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 kezelés a vehikulummal kezelt csoporthoz viszonyítva csak az első vizsgálati időpontban javította a szignifikánsan motoros teljesítményt. A trauma után 30 perccel kezelt csoport tagjai a negyedik vizsgálati napon érték a maximálisan elérhető teljesítményt (1-es érték). Ezen állatok motoros teljesítménye a vehikulummal kezelt csoporthoz képest szignifikánsan jobb volt a második mérési időponttól (1nap) egészen az utolsó mérési időpontig (7. nap).

A két kezelési módot összehasonlítva megállapítottuk, hogy a beam-balance tesztben ugyan mindkettő javította a károsodott motoros funkciókat, de a trauma után 30 perccel történő i.c.v. 100 µg/patkány L-2286-al történő kezelés hatásosabbnak tűnt, mint a trauma után azonnal történő kezelés (**4. Táblázat**).

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

A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a három vizsgált paraméter közül a trauma után közvetlenül L-2286 kezelt állatoknál lényeges javulás nem volt megfigyelhető vehikulum kezelt állatokhoz képest. Viszont a trauma után 30 perccel történő kezelés szignifikánsan növelte a mosakodások számát, de semmilyen egyéb hatása nem volt a másik két vizsgált paraméterre („crossing”, ágaskodás) (**4. Táblázat**).

Az i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 hatása az emelt keresztpalló tesztben

Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét L-2286-al kezelt csoport esetében a megemelkedett szorongási szint a vivőanyaggal kezelt állatokhoz képest szignifikánsan lecsökkent, mivel hozzájuk képest szignifikánsan több időt töltöttek a nyitott karban és ezzel együtt szignifikánsan kevesebb időt a zárt karban. Érdekes módon a trauma után azonnal L-2286-al kezelt csoport szignifikánsan töltött több időt a nyitott karban mind a vehikulummal kezelt, mind ál-műtött csoporthoz képest, de ez a trauma után 30 perccel kezelt csoport esetében nem volt megfigyelhető (**4. Táblázat**).

| Beam-balance | <i>Ál-műtött</i> | <i>Vehikulum</i> | <i>L-2286 azonnali kezelés</i> | <i>L-2286 30 perccel a trauma után</i> |
|---------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|--|
| 1 óra (érték) | 1 | 6 | 3,8±0,58 p<0,05 | 4,8±0,2 |
| 1 nap (érték) | 1 | 5,6±0,24 | 3,4±0,4 | 2,6±0,24 p<0,01 |
| 2 nap (érték) | 1 | 4,8±0,2 | 3±0,55 | 2,4±0,24 p<0,05 |
| 3 nap (érték) | 1 | 5,2±0,2 | 2,6±0,6 | 1,4±0,24 p<0,01 |
| 4 nap (érték) | 1 | 4 | 2±0,55 | 1 p<0,01 |
| 5 nap (érték) | 1 | 3,8±0,2 | 2,2±0,73 | 1 p<0,01 |
| 6 nap (érték) | 1 | 3±0,32 | 2±0,55 | 1 p<0,01 |
| 7 nap (érték) | 1 | 2,2±0,22 | 1,6±0,67 | 1 p<0,05 |
| Open-field | | | | |
| „Crossing” (db) | 117,4±2,77 | 75,8±6,09 | 98,4±11,45 | 90±15,99 |
| Mosakodás (db) | 33±3,61 | 19,8±1,39 | 28,6±2,5 | 30,6±4,37 p<0,05 |
| Ágaskodás (db) | 1,4±0,93 | 1,2±0,97 | 0,6±0,24 | 1,2±0,73 |
| Emelt keresztállás | | | | |
| Fejbetétel nyitott karba (db) | 6±1,58 | 10,4±0,51 | 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 | 3,6±0,26 | 3,2±0,66 |
| Nyitott karban töltött idő (mp) | 46,8±10,17 | 1,6±0,98 | 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 | 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 | 12,2±1,18 | 15,4±2,16 |

4. Táblázat A trauma után azonnali illetve 30 perccel későbbeni i.c.v. 100 µg/patkány L-2286 kezelés hatása a beam-balance, open-field és az emelt keresztállás tesztekben. Az adatok átlag ± SEM (p<0,05 és p<0,01 a vehikulummal kezelt állatokhoz képest).

2.3. MEGBESZELÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Korábbi vizsgálatok alapján a Marmarou-féle impakt accelerációs modell okozta agyi károsodás a motoros és magatartási/kognitív funkciók károsodását is eredményezi. 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 és RMO-14 IP axonok denzitásának eltérő mértékű csökkenése megerősítette azt a megfigyelést, hogy az axon-károsodás heterogén jelenség, mely nem minden tengelyfonatban jelenti ugyanazon kórfolyamatok aktiválódását.

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, és nagymértékben csökkenteni a trauma után kialakuló szorongás szintjét, vagyis javította a funkcionális kimenetelt. E vizsgálatok nem nyújtottak arra választ, hogy a PARP inhibitor pozitív hatását kizárólag a DAI gátlása révén fejtje-e ki, vagy esetleg szerepet játszhatott a Marmarou-féle koponyatrauma modellben igazolt diffúz neuronális károsodás kivédése is.

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

A „sötét” idegsejteket négy morfológiai típusba sorolják: Huntington típusúak (egereknél képződnek kísérletesen előidézett 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). 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. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a „sötét” idegsejteknek egyetlen sejtbiológiai típusa van, a fenti négy morfológiai típust a kóros környezet „erőszakolja” rájuk.

Jelen kísérlet során az arteria cerebri media - intraluminárisan bevezetett vékony filamentel való egy-órás elzárásának hatására képződő „sötét” idegsejtek morfológiai változásait követtük nyomon az idő függvényében.

3.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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.

Patkány transziens fokális agyi iszkémia modell

A műtétek alatt az állatokat altatógép segítségével lélegeztettük 2,5% isoflurán, 30% oxigén és 67.5% dinitrogén-oxid keverékével. A jobb oldali arteria cerebri media-t a Koizumi és mtsai által leírt műtéti eljárás szerint 1 órára lezártuk. A műtét során a nyakon a jobb oldali *arteria carotis* területét feltártuk, majd az arteria carotis külső, fő és pterigopalatinus ágát elkötöttük. A arteria carotis külső ágán keresztül egy lekerekített végű 4-0-s műanyag sebészeti fonalat vezetünk fel az arteria cerebri media-hoz, majd 1 órán keresztül ott tartottuk. Végül a fonalat eltávolítottuk, és a keringést helyreállítottuk. Közvetlenül ezután az állatok egyik részét szíven keresztül perfundáltunk 500 ml glutáraldehides fixálóval. A többi állat esetében különböző túlélési időket alkalmaztunk, ezen időpontokban a perfúzió előtt az állatokat i.p. 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, míg a formaldehides fixálás esetében: 1 óra, 1 nap és 2 nap. Az ál-műtött állatok a fent ismertetett műtéti eljárásán keresztül esett át, de ezeknél a fonalat közvetlenül a behelyezés után eltávolítottuk.

Szövetteni feldolgozás

A szíven keresztüli perfúzió után 1 nappal az agyakat eltávolítottuk a koponyából. A glutáraldehiddel fixált agyak caudális 2/3-részből 150 µm vastagságú metszeteket készítettünk frontális síkban metszve vibratóm segítségével. Minden ötödik metszetet egy speciális ezüstözési eljárással festettünk meg, amely specifikus a „sötét” idegsejtekre és reprodukálható eredményt képes nyújtani.

Az elektronmikroszkópos szövetteni feldolgozáshoz 2x2 mm²-es darabokat vágunk ki a caudo-putamen és a temporális cortex azon területeiről, ahol az ezüstözés után kompaktálódott idegsejteket vagy axonokat tartalmaztak az előbb ismertetett eljárással megfestett metszetek. Az ultrastrukturális vizsgálatokat JEOL JEM 1200EX típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal hajtottuk végre.

A formaldehiddel fixált agyak caudális 2/3-át paraffinba ágyaztuk, majd 10 µm vastagságú szeltekre metsztük szánkamikrotóm segítségével. Minden tizedik metszetet 0,1 %-os krezil ibolyával vagy 1%-os savanyú fukszin 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 a termék használati utasítása szerint feldolgoztuk és fénymikroszkóppal értékeltük.

3.2. EREDMÉNYEK

Fénymikroszkópos megfigyelések

A filament eltávolítása után azonnal fixált patkányokban a jobb oldali caudo-putamen néhány idegsejtjének valamint jobb oldali temporális cortex területén lévő némelyik piramis sejt szóma-dendrit doménje homogéne ezüstződött.

Az 1, vagy több órát túlélt állatoknál a natív, festetlen metszeten megfigyelhető volt a károsodott (nekrotikus, excitotoxikus) terület elhelyezkedése fázis-kontraszt vizsgálat alapján. 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, ami a regenerálódó „sötét” idegsejtekre jellemző tulajdonság. Egy óra túlélés után a nekrotikus területen ill. 1 és 4 óra túlélés után a temporális cortex excitotoxikus területén számos olyan homogéne ezüstződött idegsejt figyelhető meg, amelyek szóma-dendrit doménjeit nem lehetett külön-külön megfigyelni.

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, ami a pusztuló "sötét" idegsejtek jellegzetes tulajdonsága. Egy nap túlélés után a károsodott terület széli területén (penumbra zóna) ezüstződő neuronális elemek „tömör” halmaza volt megfigyelhető. Ezeknél az állatoknál az ezüstözés után mind pusztuló, mind regenerálódó „sötét” idegsejtek voltak áthatók, különösen az excitotoxikus terület periferiáján. Hat nap túlélés után az ép szöveti környezetben csak néhány fagocitáló sejt jelenléte jelezte a már elpusztult „sötét” idegsejtek helyét. Toluidin-kékkel homogéne festődtek a frissen-képződött "sötét" idegsejtek magja, citoplazmája és fő dendritjei mind a temporális cortex, mind a caudo-putamen területén. Két napot túlélt állatoknál a toluidin-kékkel festődött idegsejtek viszont már fragmentálódtak, míg 6 nap túlélés után pusztulásukat

bizonyító fagociták voltak megfigyelhetők. TUNEL-pozitív sejtmagok a csak a nekrotikus területek széli részein voltak megfigyelhetőek, főleg az egynapos túlélés után.

Elektronmikroszkópos megfigyelések

A filament eltávolítása után azonnal perfundált állatoknál néhány „kompaktálódott” idegsejt volt megfigyelhető. Ezekben az ultrastrukturális elemek közötti távolságok drámai mértékben lecsökkentek, az ER ciszternái összeszűkültek, míg a Golgi-apparátus ciszternái kitértak, a mitokondriumok mérete változatlan maradt. A sejtmag számos kisméretű kromatin-göböt tartalmazott. Egyórás túlélés esetében sok kompaktálódott idegsejt volt megfigyelhető. Ellentétben az azonnal perfundált állatokkal, a riboszómák egymáshoz nem-kötődött formában voltak jelen, és több, feltűnően nagy mitokondriumot tartalmaztak. A megnövekedett fázis-kontrasztú terület közelében 1 ill. 4 óra túlélés után a kompaktálódott idegsejtekben az ER ciszternái már normális méretűvé alakultak vissza.

Egy- ill. 2-napos túlélés után számos normális kinézetű idegsejt szómája és dendritjei mitokondrium-méretű membrán-örvényt tartalmazott. Ezek közül néhány a szómát vagy a dendritet éppen elhagyni látszott. 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, amelyeket a 6-napot túlélő állatokban asztrociták, vagy mikroglia sejtek részben, vagy egészben fagocitáltak. Az 1 napot túlélő állatokban a nekrotikus vagy excitotoxikus területeken néhány „sötét” idegsejt még kompaktabbá és elektronenzebbé vált, míg mások megduzzadtak, sőt - részben, vagy egészben „szétzilálódtak”. Ezen utóbbi sejtek duzzadt dendritekkel és glikogén szemcséket nem tartalmazó asztrocitákkal voltak körülvéve.

Két ill. 6 nap elteltével a „sötét” idegsejtek a nekrotikus-hoz-hasonló feldarabolódáson mentek keresztül. Az 1-napot túlélő állatoknál a nekrotikus területek szélén lévő, kompaktálódott-ultrastrukturájú sejtekben a sejtmagok néhány kerekded (apoptotikus) kromatin-göböt tartalmaztak. A 2 vagy több napot túlélő patkányokban az ilyen sejtek közül néhány a nekrotikus-hoz-hasonló fragmentálódáson mentek keresztül, míg mások membránnal burkolt, kompakt és homogén fragmentumokká estek szét, amelyeket glikogén-tartalmú asztrocita nyúlványok vettek körül. Ezeket mikroglia- vagy asztrocita-sejtek fagocitálták.

3.3. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Az iszkémia a keringés elzáródását jelenti. Viszont ez a mi kísérletünk esetében csak részben valósul meg, mert a caudo-putamen-ben 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. Ezért az a biokémiai kaszkád, amely az ultrastrukturális kompakciót előidézi, nagyban különbözhet ezeken a területeken. Ennek ellenére az alapvető morfológiai tulajdonságok minden újonnan-képződött „sötét” idegsejtben - mind a caudo-putamen stellatum sejteiben, mind a temporális cortex piramis sejteiben - 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 fenó-

ill. kemo-típusától. Ez a tény megerősítette a „sötét” idegsejtek képződési mechanizmusával kapcsolatos korábbi elképzelésünket.

A koponyatrauma és az elektromos sokk, továbbá a hipoglikémia hatására kompaktálódott („sötét”) idegsejtek egy hányada regenerálódik. Kezdeti fázisának 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. Esetünkben ugyanezeket a morfológiai elváltozásokat tapasztaltuk a regenerálódó „sötét” idegsejteknél.

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 távolítódik el az agyszövetből, amint ezt esetünkben is tapasztaltuk. Ebből arra következtethettünk, 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 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.

III. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A középsúlyos CFP modellel végzett kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a CFP után 30 perccel i.c.v.-beadott 100 µg PACAP szignifikánsan képes volt csökkenteni mind az APP, mind az RMO-14 IP axonok denzitását, azaz a PACAP-nak neuroprotektív hatása van a TAI mindkét megjelenési formája, az AD/B és az NFC esetében.

A PACAP neuroprotektív hatása nem volt szignifikáns az MLF-ben. Magyarázatul szolgálhat az, hogy ezen idegpálya területén az ép axonok átmérője és lefutása más, mint a corticospinális pálya területén, ahol a neuroprotektív hatás szignifikánsnak bizonyult.

Eredményeink alátámasztották a TAI impakt accelerációs modellje esetében tapasztaltakat, miszerint a PACAP hatékonyan csökkenti a maradandóan károsodott axonok számát a koponyatrauma következtében kialakuló intra-axonális transzportzavar és a NFC esetében.

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/patkány L-2286 (egy újonnan kifejlesztett PARP-gátló) szignifikánsan képes volt csökkenteni mind az APP, mind az RMO-14 IP 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 AD/B és az NFC esetében.

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

Az i.c.v.-beadott 100µg/patkány 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-keresztpalló tesztben szignifikánsan csökkentette a trauma után gyakran fellépő szorongás mértékét.

3. A fokális tranziens iszkémia esetében a sötét idegsejtek képződésére és morfológiai sajátosságaira vonatkozóan új megfigyeléseket tettünk.

Mindkét vizsgált agyterületen (caudo-putamen centrális illetve perifériás része, valamint a temporális cortex citotoxikus hatás alatt álló illetve viszonylag ép szomszédos része) a más-más mértékben csökkenő vérátáramlás ellenére az alapvető morfológiai tulajdonságok minden újonnan képződött „sötét” idegsejtben megegyeztek s azonosak voltak. Megegyeztek 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. Feltételezzük, hogy a nekrotikus környezet a pusztuló „sötét” sejtekre rákényszerít egy nekrotikus eltávolítási mechanizmust.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ PUBLIKÁCIÓK:

1. **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. *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

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 injury. *Ideggyogy Sz.* 2007 Jul 30;60(7-8):284-94.
2. **E. Kövesdi**, E. Czeiter, A. Tamas, D. Reglodi, D. Szellár, 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.: 2,017**
3. Czeiter E, Pal J, **Kövesdi E**, Bukovics P, Luckl J, Doczi T, Buki A. Traumatic axonal injury in the spinal cord evoked 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.; **Kövesdi, 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. **Kövesdi, 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. Congress, 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. Congress, Szeged, Hungary, 2007

7. E. Czeiter, J. Pal, **E. Kövesdi**, 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. Márc. 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. **Kövesdi 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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek *Dr. Büki Andrásnak* és *Dr. Gallyas Ferenc* professzor úrnak, akik felkeltették érdeklődésemet a különböző jellegű koponyasérülések patomechanizmusának vizsgálata iránt, továbbá elősegítették tudományos fejlődésemet a neurobiológia területén. Türelmükkel, szakértelmükkel és útmutatásukkal nagyban elősegítették vizsgálataim sikeres kivitelezését és PhD disszertációm sikeres előkészítését.

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

Köszönettel és hálával tartozom *Dr. Reglódi Dórának* és *Dr. Tamás Andreának* szakmai segítségükért és baráti támogatásukért a farmakológiai vizsgálatok kivitelezésében és a 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. Továbbá *Molnár Dórának*, *Bohner Katalinnak* és *Uzsoki Boglárkának* az állatok kezelésénél illetve a vizsgálatokban nyújtott nagyfokú és precíz gyakorlati segítségért.

Külön köszönet jár *Nyirádi Józsefnek*, aki bevezetett a szövettani vizsgálatok rejtjelmeibe 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* és *Dr. Bukovics Péternek*, hogy szakszerű szakmai tanácsaikkal és baráti támogatásukkal elősegítették kísérleteim kivitelezését. Továbbá *Dr. György Andreának* és *Alaa Kamnash-nak* az angol nyelvű lektorálásért.