

**A koponyasérülés által kiváltott axonkárosodás
kóreredetének vizsgálata morfológiai módszerekkel,
különös tekintettel a therápiás lehetőségekre**

PhD-értekezés

dr. Büki András

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Pécs, 1999.

Témavezető: Dr. Gallyas Ferenc

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| 1. Bevezetés..... | 5 |
| 2. Kísérletes előzmények, a vonatkozó irodalom áttekintése..... | 9 |
| 2.1. Történeti áttekintés..... | 9 |
| 2.1.1. Korai elméletek és terminológia..... | 9 |
| 2.1.2. A DAI-ra vonatkozó mai elméletek és nevezéktan..... | 10 |
| 2.2. A kalcium szerepe a DAI pathogenezisében..... | 12 |
| 2.2.1. Kalcium beáramlás és közvetlen következményei..... | 12 |
| 2.2.2. Kalcium indukálta fehérjebontás DAI-ban..... | 13 |
| 2.2.3. Calpain: egy enigmatikus cysteine proteáz..... | 15 |
| 2.2.4. Az intraaxonális kalcium akkumuláció és a DAI progressziója... | 17 |
| 2.3. A mitochondriális károsodás és befolyásolásának lehetőségei DAI-ban.. | 18 |
| 2.3.1. A mitochondriális károsodás DAI-ban..... | 18 |
| 2.3.2. A cyclosporin A hatásmechanizmusa..... | 19 |
| 2.3.3. A cyclosporin A alkalmazásának lehetőségei..... | 20 |
| 2.4. A hypothermia mint lehetséges therápia a DAI befolyásolására..... | 21 |
| 2.4.1. A hypothermia hatásának elvi alapjai..... | 21 |
| 2.4.2. A hypothermia alkalmazása DAI-ban..... | 22 |
| 3. A kísérleteinkben alkalmazott főbb módszerek és anyagok leírása..... | 24 |
| 3.1. Kísérleti állatok..... | 24 |
| 3.2. A koponyasérülés modellje..... | 24 |
| 3.2.1. Az impact akcelerációs modell jellemzése..... | 24 |
| 3.2.2. A kísérlet technikai kivitelezése..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3. A physiological paraméterek monitorizálása..... | 26 |
| 3.3. A cyclosporin A bejuttatásának leírása..... | 26 |
| 3.4. A hypothermia leírása..... | 27 |
| 3.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok..... | 27 |
| 3.5.1. Perfúziós fixálás..... | 27 |
| 3.5.2. Az agytörzs feldolgozása..... | 28 |
| 3.5.3. Metszetelőkészítés, "antigene- retrieval"..... | 29 |
| 3.5.4. Az antiszérumok jellemzése..... | 30 |
| 3.5.5. A felhasznált immunfestési protokollok és kontrollok..... | 32 |
| 3.5.6. Immun- elektronmikroszkópiai szövetfeldolgozás..... | 35 |
| 3.6. Az eredmények feldolgozása..... | 35 |
| 3.6.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka..... | 35 |
| 3.6.2. Quantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika..... | 36 |
| 4. Kísérleteink részletes ismertetése – Eredmények..... | 38 |
| 4.1. Kalcium-indukálta, calpain-mediálta spectrin proteolysis DAI-ban..... | 38 |
| 4.1.1. A kísérlet leírása..... | 38 |
| 4.1.2. Eredmények..... | 39 |
| 4.1.3. Következtetések..... | 41 |
| 4.2. A cyclosporin A - előkezelés hatásának vizsgálata DAI-ban..... | 42 |
| 4.2.1. A kísérlet leírása..... | 42 |
| 4.2.2. Eredmények..... | 44 |
| 4.2.3. Következtetések..... | 45 |
| 4.3. A trauma után alkalmazott Cyclosporin A- kezelés hatása DAI-ban..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1. A kísérlet leírása..... | 46 |
| 4.3.2. Eredmények..... | 47 |
| 4.3.3. Következtetések..... | 49 |
| 4.4. A kontrollált hypothermia hatásmechanizmusának vizsgálata DAI-ban..... | 51 |
| 4.3.1. A kísérlet leírása..... | 51 |
| 4.3.2. Eredmények..... | 52 |
| 4.3.3. Következtetések..... | 54 |
| 5. Eredmények összefoglalása (tézisek)..... | 58 |
| 5.1. A DAI pathomechanizmusáról alkotott jelenlegi képünk | 58 |
| 5.2. Amire (jelenleg) nincs magyarázat..... | 61 |
| 5.3. A DAI kutatásának irányai eredményeink tükrében..... | 62 |
| 6. Irodalomjegyzék, Köszönetnyilvánítás..... | 64 |

1. Bevezetés

A baleset során bekövetkező agysérülés gyakorisága a motorizációval párhuzamosan emelkedik, a fejlett egészségüggyel rendelkező ipari országokban a 40 év alatti felnőtt lakosság körében a vezető halálokat képezi, s elsősorban a fiatal, munkaképes férfiakat érinti. A National Head Injury Foundation és a National Institute of Health vizsgálatai alapján az Amerikai Egyesült Államokban 2,1 millió baleseti agysérülés ("Traumatic Brain Injury", TBI) történik évente, ezekből 100,000 halálos kimenetelű, 500,000 kórházi kezelést igényel. A TBI okozta elhalálozás a 35 év alatti népesség-csoportban három-és-félszer nagyobb, mint a daganatos és a keringési betegség okozta halálozás együttvéve. Évente 90,000 túlélőt nyomorít meg a sérülés, 5,000 új, trauma-okozta epilepsziás beteget regisztrálnak s 2,000 beteg marad tartósan vegetatív állapotban. A TBI teljes kezelési költsége évi 48 milliárd USA dollárra rúg[91]. Miközben hasonló epidemiológiai adatok a hazai szakirodalomban nem állnak rendelkezésre, az úthálózat fejletlensége és a gépkocsi park átlagéletkora alapján valószínűsíthető, hogy a TBI Magyarországon hasonló nagyságrendű epidemiológiai problémát képez.

A baleseti agysérülések vázlatos, klasszikus osztályozása során fokalís és diffúz agysérülést szokás megkülönböztetni, a két forma társulhat. E disszertáció tágabb értelemben vett témája, a diffúz sérülések közé sorolt axonális károsodás ("Diffuse Axonal Injury", DAI) típusosan accelerációs-decelerációs mechanizmussal kialakuló, a fehérállományt, azon belül is elsősorban a corpus callosumot valamint a hosszúpályák agytörzsi szakaszát érintő elváltozás [2-4;6;19;32;53;54]. Típusos klinikai megjelenési

formája képzakotó vizsgálatokkal kizárt térfoglaló folyamat hiányában fennálló súlyos tudatzavar, a prognózis rendszerint rossz[52;53;63].

Noha a kórkép jelentőségét már a század közepén felismerték, további kutatását és kezelését hátráltatta, hogy a DAI-ra úgy tekintettek, mint a trauma hatására létrejövő axonszakadásra, amit therapiásan befolyásolni nem lehet[2-6;19-21;34;53;168-170]. Ez az álláspont az elmúlt két évtizedben döntően megváltozott, utat nyitva a DAI és ezáltal a diffúz TBI kezelését célzó kísérleteknek[38;132;133;136].

Disszertáciomban a kalcium-indukálta fehérjebontó folyamatoknak a DAI pathogenezésében játszott szerepével foglalkozom, teret szentelve a kalcium indukálta mitochondriális károsodás kórerediti szerepének. A DAI therapiás befolyásolásra végzett kísérleteink külön fejezetekben kerülnek ismertetésre. A vizsgálatokban felhasznált állatkísérletes modell leírását az Anyag és Módszer fejezet tartalmazza, az egyes fejezetekben leírandó kísérletekben felhasznált speciális metodikai elemeket külön, fejezetenként ismertetjük. Hasonlóan, az egyes fejezetek végén összefoglaljuk az adott kísérletekben elért eredményeket, míg a disszertáció legfontosabb eredményeit és következtetéseit a záró fejezet adja közre*.

*Céltűzéseim összefoglalása előtt meg kell jegyezmem, hogy az itt ismertetendő vizsgálatokat döntően a Virginia

Commonwealth University Anatómiai Intézetében végeztem (részletlen ld.: Köszönetnyilvánítás), grafikonjaim egy része angol nyelvű közleményeinkből származik, ezek szövegét a tengelyek hitelességének megőrzése miatt nem fordítottam magyarra, ezért a Tisztelt Bíráló és Olvasó szíves elnézését kérem.

Kutatási célkitűzéseinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1., A kalcium-beáramlás által indukálta intraaxonális proteolízis szerepének tisztázása a koponya trauma által kiváltott axonális károsodás kóreredetében.

- i. annak igazolása, hogy a Ca^{2+} indukálta fehérjebontás valóban szerepet játszik a trauma kiváltotta axonális károsodás kialakulásában
- ii. a Ca^{2+} indukálta proteolízis térbeli és időbeli lefolyásának, esetleges compartmentalizációjának meghatározása ultrastrukturális szinten
- iii. a kalcium indukálta fehérjebontás és további, korábbi kísérletekben meghatározott, a koponya trauma által kiváltott axonális károsodásra jellemző kórfolyamatok térbeli és időbeli viszonyának leírása

2., A koponyasérülés során károsodott axonok energia- és ion-háztartásának fenntartását a mitochondriumok épségének és működőképességének megőrzése révén elősegítő szer (cyclosporin A) hatásának leírása kísérletes axonkárosodási modellen.

- i. annak igazolása, hogy a mitochondriális membrán permeabilitási pórusának kinyílását gátló cyclosporin A a kísérletes sérülés előtt adva képes megelőzni a kalcium akkumuláció kiváltotta intraaxonális fehérjelebomlást s a következményes/egyidejű citoskeletális károsodást
- ii. annak megállapítása, hogy a cyclosporin A terápiás hatását a traumás károsodás után is képes kifejteni, s ez a hatás tartós axonális védelmet jelent

3., A koponyasérülés során károsodott axonok integritásának

megőrzése/helyreállítása szabályozott hypothermia hatására.

- i. annak megállapítása, hogy a széles körben, klinikailag is alkalmazott therapiás, szabályozott hypothermia hatása csökkenti-e az intraaxonális, kalcium indukálta fehérjelebomlást s a következményes/egyidejű citoskeletális károsodást
- ii. annak tisztázása, hogy a hypothermia esetleges jótékony hatása az intraaxonális, kalcium indukálta fehérjelebomlás s a következményes/egyidejű citoskeletális károsodás átmeneti gátlásában nyilvánul-e meg, avagy az axonális védelem a felmelegítési szak végén is megfigyelhető.

2. Kísérletes előzmények, a vonatkozó irodalom áttekintése

2.1. Történeti áttekintés

2.1.1. Korai elméletek és terminológia

A klasszikus neuropathológia által alkalmazott felosztások alapján a neurotraumatológiai elváltozások két fő csoportba soroltattak, focalis illetve diffúz sérüléseket különböztetve meg. A diffúz agysérülések alcsoportjában ugyancsak elkülönítünk négy klasszikus alcsoportot, a diffúz axonális károsodást ("diffuse axonal injury"), hypoxiás agykárosodást ("hypoxic brain damage"), agyduzzadást (brain swelling) és a rendkívül korán halálhoz vezető, klinikai relevanciával alig bíró diffúz vasculáris sérülést ("diffuse vascular injury"). Klinikai és - talán éppen ezért - kutatási szempontból a diffúz axonális károsodás a legnagyobb jelentőségű [177].

Annak ellenére, hogy a neuropathológusok és az idegsebészek érdeklődése a század elején elsősorban a kezelhetőnek tartott, fokális traumás elváltozásokra összpontosult, számos megfigyelés már a század közepén hangsúlyozta a diffúz agysérülés klinikopathológiai jelentőségét, a TBI mortalitásában és morbiditásában játszott szerepét [34;176]. A kórkép jelentőségének fokozatos felismerését és az arról alkotott elképzeléseket tükrözi a nomenklatúra változása. Strich, aki úttörő jelentőségű munkájában 1956-ban a DAI-t a "cerebralis fehérállomány diffúz degenerációja"-ként definiálta [168], 1961-ben "traumás eredetű idegrost-szakadás"-ként említi a kórképet [169]. A további megfogalmazások, mint "az agy szakításos sérülése" [124], vagy a nehezebben fordítható "diffuse damage of immediate impact type" [1] jól tükrözi azt a korabeli szemléletet, amely a DAI-t a sérülés hatására *azonnal* létrejövő *axon-*

*szakadás*ként értelmezte. A kórképet végül Adams definiálta “diffuse axonal injury” néven, 1982-ben [2].

Adams klasszikus leírása szerint a trauma során ébredő erők hatására az axon elszakad, proximális szegmentuma visszahúzódik, miközben az axoplazma kis része ballonként előbóltosul belőle; ezt később gliális hegszövet veszi körül s a károsodott axonszakasz Waller szerinti degenerációval pusztul el [1;2;7]. Ez a kis axoplazma-labdácska (axonal retraction ball) képezte évtizedeken át a DAI diagnózisának pathomorfológiai szubsztrátumát (**1.A. ábra**).

2.1.2. A DAI-ra vonatkozó mai elméletek és nevezéktan

A nyolcvanas években Gennarelli munkájának köszönhetően epidemiológiai módszerekkel sikerült igazolni, hogy a DAI 50%-ban felelős a tartós tudatzavarért illetve 35%-ban a mortalitásért a nem térfoglaló jellegű TBI esetekben [53]. E klinikailag is jelentős kórkép kezelésére az első reményt Povlishock és társainak 1983-ban közölt munkája jelentette, minthogy – szemben a korábban elfogadott elméletekkel – kimondta, a DAI fokozatosan progresszív, következésképpen terápiásan befolyásolható folyamat [136]. Azóta e munkacsoport elméletét számos állatfajban és trauma modellben valamint humán szövettimtakon is igazolta [32;38;125;132-134;140].

Ezen elmélet lényege, hogy a trauma kiváltotta axonális károsodásként meghatározott kórfolyamatot az axonra ható nyíróerők indítják el. *Fénymikroszkópos* szinten vizsgálva a károsodott axonszakaszok a sérülést követően azonnal (öt percen belül) axolemmális permeabilitási zavart mutatnak (“mechanoporáció”), azaz olyan anyagokat vesznek fel (tormagyóképeroxidáz) (**1.B. ábra**), amely az ép



1. Ábra. A: Axonális retrakciós ballon képződése a fasciculus longitudinalinalis medialis területén, 24 órával koponyasérülés után. (Golgi impregnáció, humán szövetminta Povlishock Professor gyűjteményéből). **B:** Károsodott axonszakasz a corticospinális pálya medulláris szakaszán tormagyóké-peroxidáz intrathecális beadását követően koponyasérülésnek kitétt patkányban, tizenöt perccel a trauma után. Jól látható az axon fokális duzzadása, mely az axoplazmaticus transzport zavarával párhuzamosan progrediál. (Jel: 15 μm).

membránszerkezetű neuritba nem juthat. Az axoplazmatikus transzport fokális zavara *fénymikroszkópos* immunhisztokémiai módszerekkel, neurofilamentumok és transzportfehérjék fokális felszaporodásának kimutatásával igazolható, s ennek háttérében *ultrastrukturálisan* az érintett axonszakaszon a mikrotubulusok számának drasztikus csökkenése áll amit a neurofilamentumok közti távolság valamint az axon átmérőjének csökkenése, a mitochondriumok duzzadása, a myelin hüvely fellazulása, periaxolemmalis virtualis terek létrejötte kísér (5 perc-3 óra). Minthogy az axoplazmatikus transzport zavara miatt az érintett axonszakaszon a neurofilamentumok, mitochondriumok felhalmozódnak, ennek megfelelően fénymikroszkóposan az axon duzzadása egyre nyilvánvalóbb (5 perc-3 óra), s végül az érintett axonszakasz duzzadt, néhol vacuolizált ballon formájában lefűződik (3-6 óra), a distalis szakasz pedig Waller szerint degenerálódik (12-48 óra).

Újabb kutatások további megerősítést adtak ezen elméletnek, mikor kiderítették, hogy a nervus opticus túlnyújtásán alapuló modellben csak a leg súlyosabban károsodott axonok szenvednek azonnali szakításos sérülést [103].

A témával foglalkozó legtekintélyesebb laboratoriumok közös álláspontját tükröző, lényegében a fent leírt elméletet szentesítő, összefoglaló tanulmányban ajánlott nevezéktan szerint az emberben TBI által előidézett axonális károsodást "diffuse axonal injury"-nek (DAI), míg a kísérleti állatban különféle TBI modellekben létrehozott axonsérülést "traumatic axonal injury"-nek (TAI) nevezzük.

Míg e konszenzusos elmélet részletes leírását szolgáltatja a DAI kialakulásának, és okát adja az axoplazmatikus transzport zavarának illetve kiterjedésének következményeire, annak igazolására illetve megállapítására nem vállalkozik, hogyan

váltja ki az axon vongálódása következtében létrejövő pillanatos permeabilitási változás ("mechanoporáció") az axon elszakadásához vezető pathológiás eseménysort. A jelen disszertációban ismertetendő kísérletek egyik célja éppen a hiányosság pótlása volt.

2.2. A kalcium szerepe a DAI pathogenezisében

Ebben az alfejezetben első célkitűzésünk elméleti háttérét kívánom felvázolni.

2.2.1. Kalcium beáramlás és közvetlen következményei

Míg a perikaryonokat érintő kórfolyamatok esetében a kalcium beáramlás, intraneurális kalcium-akkumuláció káros hatása széles körben vizsgált s elfogadott jelenség [158;160], addig a kalcium indukálta proteolitikus folyamatok szerepe az axonok károsodásában nem egyértelműen tisztázott. Az axonokon egyrészt nincsenek excitatorikus aminosavak által szabályozott kalcium csatornák, másrészt a feszültség szabályozott csatornák denzitása a myelin hüvellyel borított axonszakaszon rendkívül alacsony [171;187].

A klasszikus elméletek szerint az axon károsodásakor az axonra ható nyíróerők következtében létrejövő axolemmális permeabilitás változás (ún. mechanoporáció) hatására beáramló kalcium proteolitikus enzimeket aktiválna, melyek azonnal megtámadják és az axon egészében igen rövid idő alatt "megemészlik" a struktúrális fehérjéket [10;101;103]. Az intraaxonális kalcium beáramlás *in vivo* igen nehezen megfogható, ugyanígy a kalcium-indukálta proteolitikus folyamatok követkeése is nehézségekbe ütközött (bővebben ld.:2.2.2.).

A kalcium beáramlásának hatására utaló indirekt jel a mikrotubulusok eltűnése.

Valószínűsíthető ugyanis, hogy a mikrotubulusok számának drasztikus csökkenése a DAI által érintett axonokban a focalis kalcium koncentráció növekedésének hatására történő mikrotubulus-széttesés következménye [102;139].

Ugyancsak – mint ezt később disszertációmban kifejtem - a mitochondriumok duzzadásának és szétesésének oka is lehet a megnövekedett kalcium koncentráció, mely a mitochondriumok divalens kationnal történő “túltöltődését” okozhatja [26;120;122].

2.2.2. Kalcium indukálta fehérjebontás DAI-ban

A kalcium aktiválta proteolízis vizsgálatát forradalmasította, hogy Siman és munkatársai olyan immunsavót állítottak elő, mely a mikromolaris calpain által hasított alfa-spectrin alegység 145-150kD molekulásúlyú fragmentumát, egy rendkívül stabil, más proteázok által nem képzett fehérjét ismeri fel [142;162-164]. Immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok a spectrin molekula számos változata közül a neurális formát, a két alfa s két béta alegység alkotta “brain spectrint” vagy fodrint az axoplasmában, a citoszkeleton elemeihez kapcsoltan localizálták [60;190]. A citoszkeletont a spectrin az axoplasmában található további elemekhez, főként mitochondriumokhoz rögzíti, ugyanakkor a mitochondriumok felszínén is spectrin “háló” alakul ki. Emellett, mint az axolemma alatt található subaxolemmális hálózat vagy más néven kortikális citoszkeleton, (membrán-szkeleton) alkotóeleme, a spectrin ankyrinen keresztül illetve közvetlenül, ún. “non-ankyrin-binding domain” -eken keresztül is kapcsolódik integráns membránfehérjékhez [36;60]. A spectrin részt vesz a szinaptikus vezikulák kiürítésében, továbbá a fentiekben ismertetett anatómiai lokalizációjának

megfelelően a membrán szerkezeti integritásának elengedhetetlen eleme. Utóbbi szerepére példa a spherocytosis nevű kórkép létrejötte, melynek hátterében az erythroid spectrin szerkezeti hibája áll [71] [60]. A calpain - fiziológias folyamatokban igazoltan - képes a spectrin hasításával a membrán szerkezetének átalakítására, mint például a myoblast fúzió során [84].

Miközben a calpain *fiziológias* aktivitásának, a *limitált strukturális proteolízis*nek egyik feltételezett szubsztrátjaként azonosították a calpait, egyre nagyobb érdeklődés övezte a calpain "túлиндukciója", a *patológias* szintű kalcium-koncentráció okozta enzimaktiválódás következtében létrejövő spectrin-lebomlás pathophysiologiai szerepét különböző kórképekben [1;12;30;31;43;60;73;74;92;142;162-164;190].

Közvetlenül kísérleteink megkezdése előtt láttak napvilágot azok az eredmények, melyek szerint calpain aktiválódását vizsgálva illetve, -elsősorban a fent említett immunsavót felhasználva- calpain-specifikus spectrin fragmentumot találtak károsodott perikaryonokban és necrotikus környezetben elhelyezkedő axonokban [12;13;15;76;114;145], calpain antagonisták adásával pedig az állatok functionális felépülése javíthatónak tűnt [131;147]. Ezek a modellek kivétel nélkül súlyos agy/gerincvelő sérüléssel, kitejedt necrotikus üreg képződésével jártak, tehát olyan folyamatokban, amelyekben a kalcium jelentős mennyiségben válik szabaddá és kiterjedt membránkárosodás alakul ki. Logikusnak tűnt tehát a kérdés, van-e, s ha igen, milyen szerepe lehet a kalcium aktiválta spectrin proteolízisnek egy olyan, traumás eredetű axonkárosodási modellben, amelyben a sérülés foka *kizárja* necrotikus üregek kialakulását, kontuziózás vagy burki vérzés képződését?

A kalcium beáramlás okozta fehérjelebontásnak a trauma kiváltotta axonális károsodás kórfolyamatában és az axon-integritás károsodásban játszott szerepe vizsgálataink megkezdésekor nem volt tisztázott; számos megfigyelés utalt arra, hogy a korábban feltételezett, fentebb röviden említett, trauma kiváltotta azonnali "axonemésztés" [10] [101] [103] helyett inkább egy fokozatosan progrediáló - tehát ismét csak therápiásan vélhetően befolyásolható - folyamatról van szó, ugyanis károsodott permeabilitású órákkal a trauma után is csaknem egészséges ultrastrukturát mutattak, kizárva egy kontrollálatlan, gyors, minden vagy semmi válasz alapján kialakuló, a károsodott axonszakasz egészére kiterjedő, kalcium indukálta masszív fehérjelebontás lehetőségét [125;126;141].

2.2.3. Calpain: egy enigmatikus cysteine proteáz

Mint a fenti szakaszból is kiderült, a kalcium indukálta fehérje lebontásban résztvevő enzimek közül az évtized közepén a figyelem a calpain nevű enzim (-család) felé fordult. Mivel a disszertáció ezen proteáz működése köré épül, röviden összefoglaljuk az enzim legfontosabb jellemzőit.

A calpainokat, melyek preferált hasítási helyüknek megfelelően a cysteine proteázok családjába tartoznak, 1964-ben izolálták patkány agyból (bővebben lásd: [13;163;184]). E neutrális-pH-n aktív enzimeszalád két alapvető, korán elkülönített formája közül az egyik mikromoláris, a másik millimoláris kalcium koncentrációra aktiválódik, innen kapták nevüket: μ - (I)-calpain illetve m- (II)-calpain. Azt, hogy az axonális pathológiában a kalcium indukálta calpain aktiválódás szerepet játszhat, sokáig kizárni látszott, hogy az I-es típusú calpaint inkább a sejttestben és dendritben fordul elő,

míg az axonban inkább csak a kettes, millimoláris kalcium aktiválta formát vélték fellelni. Ráadásul kezdetben úgy gondolták, hogy az utóbbi enzim aligha aktiválódhat, hiszen az indukciójához szükséges kalcium koncentráció csak kivételesen jöhet létre [102;121;140].

Ma már tudjuk, hogy a mikromoláris kalcium aktiválta-forma éppúgy előfordul az axonokban is, továbbá arra is fény derült, hogy a calpain autolysise jelentősen növeli annak kalcium-szenzitivitását, illetve, a calpain aktiválódása során lezajlik egy a cytosolból a membrán közelébe történő transzlokáció, illetve a membrán foszfolipidekkel való asszociáció, amely szintén a kalcium-affinitás radikális növekedését eredményezi [11;30;31].

A vitális kalcium-koncentrációt regisztráló technikák alkalmazásával az is ismertté vált, hogy egyes intraneuronális compartmentekben extrém magas kalcium koncentráció (ún. "kalcium- spike") alakulhat ki [86;143;144]. Az m-calpain pathophysiológias szerepe melletti további adat, hogy, legalábbis *in vitro* sikerült igazolni egy olyan "calpain-cascade" létét, melyben a calpain mikromoláris formája képes lehet a millimoláris forma aktiválására[9;178].

A calpain physiológias szerepét részben már említettük: limitált strukturális proteolízis révén a membrán alakváltozásában, membránfusióban, vesiculák dockolásában és kiürülésben, továbbá a szinaptikus plaszticitás kialakításában játszhat szerepet [60;184].

Pathológias aktiválódásának az öregedés, a sclerosis multiplex illetve az

Alzheimer kór kialakulásában lehet szerepe [156;164]. Ugyanakkor, mint a disszertációban erre többször kitérünk, a pathológias kalcium akkumuláció hatására

létrejövő excessive strukturális fehérjebontásnak, elsősorban a spectrin subaxolemmális emésztésének súlyos következményei lehetnek a membrán integritása, áteresztőképességének patológiás megváltozása szempontjából [8;13;16;164;186], másrészt a mitochondrium felszínén elhelyezkedő spectrin emésztése a mitochondriális pathológia kiterjedéséhez, a mitochondriális membrán károsodásának elősegítéséhez is hozzájárulhat[8;61].

2.2.4. Az intraaxonális kalcium akkumuláció és a DAI progressziója

Túl az intraaxonális kalcium akkumuláció fent részletezett lehetséges következményein, említést érdemel annak kapcsolata a DAI progressziójával. Ahogy a korábbiakban említettük, a mikrotubulusok számának csökkenése a kalcium beáramlás közvetlen következménye, s egyúttal az axoplazmatikus transzport károsodásán keresztül az intraaxonális organelum-akkumulációnak s így a DAI progressziójának fő hajtóereje. A kalcium beáramlása további citoskeletális változásokat indukál: számos megfigyelés szerint az axolemma mechanoporációja helyén (amit az egyébként extraaxonálisan elhelyezkedő, a liquortérbe adott tormagyökér-peroxidáz, HRP intraaxonális akkumulációja jelez) a neurofilamentumok összeesapódnak, "kompaktálódnak" ("neurofilament compaction", NFC) [125;126;134;138;140]. Ezen axonszakaszok olyan immunszérumokkal lesznek jelölhetőek (pl. RMO-14 monoclonális ellenanyag, melyet a disszertációban ismertetendő kísérletekben használtunk), melyek csak akkor kapcsolódnak a neurofilament közepes molekulasúlyú alegységének ("M-subunit") tövéhez ("rod domain"), ha az oldalkarok ("sidearms") korábban lehasadtak vagy alapvető alaki változást szenvedtek, s ezáltal a rod domain-

epitópok hozzáférhetővé válnak. A ma érvényes elméletek szerint a neurofilamentek egymáshoz képesti távolságát az oldalkarokon elhelyezkedő foszfátcsoportok közötti tasztító erők határozzák meg ("repelling forces"). A kalcium beáramlása proteolitikus enzimeket aktiválva az oldalkarok lehasadásához vezethet, továbbá a calciuneurin nevű, kalcium-aktiválta foszfátáz indukciója révén szintén az oldalkaroknak a neurofilament kompaktálódást elősegítő módosulását okozhatja [121;126]. Mindez jelentősen felgyorsíthatja az intraaxonális fehérjele bomlás folyamatát, hiszen a neurofilamentumok defoszforilált formában jóval érzékenyebbek fehérjebontó enzimekre [51;64;123;146;150].

Vizsgálataink megkezdésekor nemcsak az intraaxonális, kalcium indukálta fehérjebontás pontos térbeli/idebeli lokalizációja volt ismeretlen hanem annak más, intraaxonális, a DAI-hoz társuló folyamatokkal való kapcsolata is feltáratlan volt.

2.3. A mitochondriális károsodás és befolyásolásának lehetőségei DAI-ban

Ez az alfejezet második célkitűzésünk elméleti háttérét foglalja össze.

2.3.1. A mitochondriális károsodás DAI-ban

A traumás eredetű axonális károsodás ultrastrukturális jellemzője a korai mitochondriális károsodás kialakulása [32;125;126;134;138;140;141]. Az érintett axonszakaszokon már 5 perccel a trauma után ballonszerűen duzzadt mitochondriumok jelennek meg, melyeknek általában már krisztái sem láthatók. A jelenség morfológiailag teljesen megfelel a mitochondriális permeabilitási tranzíciós pórus kinyílását követő végzetes mitochondriális duzzadás képének. Maga a permeabilitási

tranzíció ("mitochondrial permeability transition", MPT) jelensége fiziológias, a mitochondriáisan tárolt kalcium kiáramlásáért, s így vélhetően a "kalcium indukálta kalcium felszabadulás" kialakulásáért felelős [158;160;181]. Ugyanakkor a pórus "túlaktíválódása" az 1.5 kD molekulású alatti anyagok beáramlásához, következményes folyadék-akkumulálódáshoz, a mitochondrium duzzadásához, a külső, kisebb felületű membrán következményes szakadásához s az organelum pusztulásához vezet [110;160;193]. Ez a fajta túlaktíválódás akkor jön létre, amikor a cytoplazmatikus/axoplazmatikus kalciumból túlkínálat lévén a mitochondrium divalens kationokat halmoz fel, ezáltal fokozatosan felborítva a transzmembrán potenciált.

Ha a kalcium beáramlásának a traumás axonkárosodás kórfolyamatában feltételezett szerepét illetve az axolemmális permeabilitás-változás heveny kialakulását tényként fogadjuk el, fel kell tételezzük, hogy az axont ért trauma után korán fennállnak a mitochondriumok MPT-mediálta károsodásának feltételei, továbbá, mint fent részleteztük, észlelhetők a mitochondriális károsodás morfológiai jelei. Mindezek alapján ésszerű a feltételezés, hogy a mitochondriális membrán permeabilitási tranzíciót gátló szerek képesek lehetnek a trauma kiváltotta axonális pathológia mitochondriális komponensének kivédésére.

2.3.2. A cyclosporin A hatásmechanizmusa

A CsA sejten/axonon belüli hatását az immunophilin fehérjék családjába tartozó cyclophilinhez való kapcsolódásán keresztül fejt ki [93;148]. Ez a fehérje a mitochondriális matrixban és a cytosolban helyezkedik el. Oxidatív stressz-állapotokban a cyclophilinek a mitochondrium membránjában olyan konformáció- változást segítenek

elő, mely a MPT jelenségének kialakulásához vezet. Ezt a konformáció változást és így a következményes pórus-kinyílást a CsA meggátolja [33] [18;44;65;69;83;89;116;151;180;182;189].

A CsA-cyclophilin komplex további, cytosolbeli célpontjai között szerepel a calmodulin-dependens serine/threonine phosphatase – a calcineurin [94;95] [148]). Ezen enzim gátlásának képessége tette a CsA-t széles körben alkalmazott immundepresszánsná: a lymphocytákban ugyanis a calcineurin egy nucleáris, transcripciós faktor defoszforilálása révén indukál T-sejt proliferációt [83;93;151].

Habár a CsA-t korábban trauma modelleken nem alkalmazták, több munkacsoport igazolta, hogy a szer alkalmas lehet az ischaemiás eredetű neuron-károsodás kivédésére a mitochondriumok működőképességének fenntartása, s az ionhomeostasis helyreállítása révén [16] és Siesjö, 1996, [42;44] [65;89;180;182]. Bár a fentiek értelmében az sem zárható ki, hogy a CsA neuroprotektív hatásában lehet szerepe a calcineurin gátlásának, több kísérlet eredménye utalt arra, hogy – legalábbis ischaemiában - a neuroprotektív hatás bizonyosan az MPT-gátlásán alapul [44;104;135;137].

2.3.3. A cyclosporin A alkalmazásának lehetőségei

Okonkwo és Povlishock úttörő jelentőségű kísérlete igazolta, hogy a CsA harminc perccel a trauma előtt adva képes kivédeni a sérült, tormagyökér peroxidázt akkumuláló axonokban a mitochondriális károsodás kialakulását. Túl ezen, huszonnégy órával a trauma után a CsA-előkezelt állatokban a megszakadt axoplazmatikus transzportot mutató, duzzadt, béta-amyloid precursor proteint halmozó axonok denzitása a DAI-nak kitétt területeken és idegpályákban szignifikánsan lecsökkent [122].

A kalcium indukálta, calpain-mediálta fehérjelebontásról korábban leírtakat szem előtt tartva azt tételeztük fel, hogy a CsA a mitochondrium szerkezeti egységének és funkcionális állapotának megőrzésén keresztül képes lehet a proteolitikus folyamatoknak az energiaháztartás zavara által előidézett tovaterjedését és felgyorsulását megakadályozni. Hasonlóképpen kedvező hatást vártunk a citoskeletális átrendeződés megakadályozása tekintetében is.

2.4. A hypothermia mint lehetséges terapia a DAI befolyásolására

2.4.1. A hypothermia hatásának elvi alapjai

A traumás eredetű axonális károsodás kezelésében a hypothermia alkalmazása [80;81], akárcsak más kísérletes traumás modelleken [22;23] és klinikai vizsgálatokban [97;107;152;157] jótékony hatásúnak bizonyult.

Bár a hypothermiát a traumás agykárosodás kezelésében számos országban, elsősorban Japánban a klinikai rutin gyakorlatban felhasználják és az USA-ban is széleskörű klinikai kísérletsorozat indult a TBI befolyásolására való alkalmassága megítélésére, meglepően keveset tudunk arról, hogyan is fejt ki pontosan jótékony hatását.

Ismert, hogy a hypothermia részben az enzimátikus folyamatok reakciósebességének lassításával, így a metabolikus folyamatok fékezésével [75], részben a szabadgyök képződés több úton történő gátlásával [58] [149], a vér-agy gát zavarának kiküszöbölésével [135;165], az intracelluláris kalcium-akkumuláció akadályozásával [77;108;109], excitatorikus mediatorok felszabadulásának gátlásával [58] hathat, illetve direkt membránvédő hatású lehet [75]. Mindazonáltal a hypothermia pontos

hatásmechanizmusát az *axonális károsodás kivédésében* mindezidáig nem sikerült meghatározni.

A hypothermia therapiás alkalmazásának általános elveiben sem sikerült mindezidáig teljes egyetértésre jutniuk a témát kutatóknak. Az utóbbi években közölt vizsgálatok arra utalnak, hogy a kezelés sikeressége szempontjából különös jelentőségű a fokozatos, hosszú időszakason át történő felmelegítés, szemben a gyors felmelegítéssel [78;96-98].

2.4.2. A hypothermia alkalmazása DAI-ben

Azt a feltételezést, hogy a hypothermia többek által hangsúlyozott "membrán protektív", "membrán stabilizáló" hatása révén képes lehet a DAI pathogenezisében igazoltan szerepet játszó membránpermeabilitás-változások kivédésére és ezáltal a károsodott axonokban megfigyelt cytoszkeletális változások megelőzésére, Povlishock és munkatársai több kísérletben vizsgálták. Munkájuk során igazolták, hogy a pre- illetve korai post-traumás hypothermia szignifikánsan csökkentette a károsodott, APP-t akkumuláló, tehát APP-immunreaktív (IR) axon-szegumentumok denzitását a medulláris pyramis területén [80]. További vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a korai post-traumás hypothermia nemcsak a károsodott axonok denzitásában okoz pozitív változást, hanem az állat motoros teljesítményének, képességeinek visszanyerését is kedvezően befolyásolja [81]. Noha a disszertációban ismertetendő vizsgálataink megkezdése előtt nem volt ismert, hogy a kalcium indukálta fehérjebontás a DAI pathogenezisében milyen szerepet játszik, az tudott volt, hogy a kalcium-indukálta, calpain-mediálta spectrin proteolysis, tehát e fontos neurális strukturfehérje lebontása jelentősen felgyorsul már a

hőmérséklet minimális emelésével is [11]. Ugyancsak ismert volt, hogy a spectrin bomlása könnyebben zajlik magas hőmérsékleten[70] [186].

Mindezek alapján, kézenfekvőnek találtuk annak vizsgálatát, hogy a hypothermia a DAI-ban kifejtett terápiás hatását képes-e a pathogenesisben általunk oly fontosnak tartott kalcium indukálta strukturális proteolízis befolyásolásának útján kifejteni, illetve, hogy ez az esetleges hatás mennyire biztosít tartós védelmet és mennyiben tekinthető csak az enzimátikus folyamat lassítása átmeneti következményének.

3. A kísérleteinkben alkalmazott főbb módszerek és anyagok

leírása

3.1. Kísérleti állatok

A disszertációban ismertetendő kísérletek mindegyikét hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük, melyek súlya 375-395 gramm között változott. Az állatokat a Charles River cég szállította, a kísérletek elvégzéséig elhelyezésükről és élelmezésükről a Virginia Commonwealth University (VCU) Animal Facilities munkatársai gondoskodtak. Az állatokon végzett minden nemű beavatkozás a NIH és a Society for Neuroscience normáinak megfelelően, a VCU Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Protocol for Use of Vertebrate Animals in Research alapján történt.

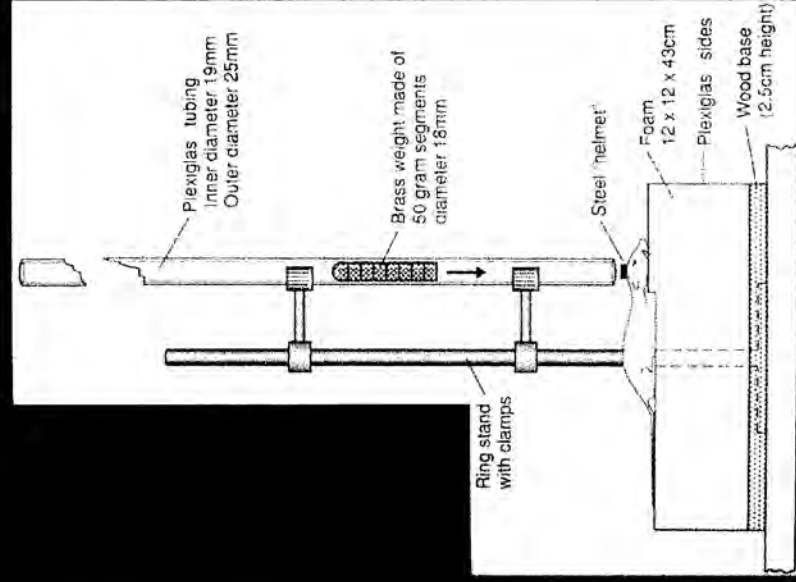
(Ezen elvek teljességgel megfelelnek az MTA Regionális Etikai Bizottsága által kiadott irányelveknek.)

3.2. A koponyasérülés modellje

3.2.1. Az impakt-akcelerációs modell jellemzése

Kísérleteinkben a jól reprodukálható és megbízható eredményeket adó, széles körben használt és karakterizált, Foda és Marmarou által közölt impakt accelerációs (IA), zárt koponyasérülési modellt [41] alkalmaztuk[99] (2. ábra)[140]. Az IA-modell kiválóan alkalmas a nagy sebességgel közlekedő járművek egymással vagy gyalogossal való ütközése során észlelt, accelerációs – decelerációs mechanizmussal létrejövő DAI patomechanizmusának vizsgálatára, hiszen alkalmazása során koponyatörés vagy subduralis haematoma, illetve olyan, focalis sérülés, pl. contusio vérzés, mely agyi compressio tüneteket okozna, nem alakul ki.

A. Marmarou, *et al.*



2. Ábra. A zárt koponyasérülés modellezésére szolgáló, Foda és Marmarou által leírt „impact accelerációs” készülék rajza. A két méter magasból lezuhanó 450 gramm súlyú nehezék a Bregma és a Lambda craniometriás pontok között elhelyezkedő fém sisakra esve accelerációs-decelerációs illetve vongáló-nyíró hatással okoz megbízhatóan diffúz agytörzsi axonkárosodást.

A DAI a modellben elsősorban a hosszúpályák agytörzsi szakaszán jön létre, így a tractus corticospinalis (TCSp) medullaris szakaszán, a decussatio pyramidorum területén, a lemniscus medialis (LM) és a fasciculus longitudinalis medialis (FLM) nyúltvelői szakaszán [140].

3.2.2. A kísérlet technikai kivitelezése

Vizsgálataink során a patkányokon intratrachealis narcosist alkalmaztunk (ITN).

A narcosis indukciója során az állatokat egy plexibúra alá helyeztük, ahol 5 percen át 4% Isoflurane (Iso Flo, Abbott Laboratories, North Chicago, IL) gázt lélegeztek be, majd orotrachealis úton intubáltuk, s az intubációra szolgáló szilikon csövön át 1-2% Isoflurane, 30% O₂ és 70% N₂O keverékével lélegeztettük/altattuk őket Surgivet/Anesco lélegeztető gép alkalmazásával. A narcosis során az állatokat hasonfekvő helyzetben tartva, hosszanti bőrmetszés után, a galea leválasztását követően egy-centiméter átmérőjű, kicsiny fémkorongot rögzítettünk fogászati akriláttal a Bregma és a Lambda craniometriás pontok közötti tér közepére, a középvonalban (2. ábra). Ezt követően az állatot ráhelyeztük egy kemény, habszivacs alapra, mely alátámasztotta a fejet, oly módon, hogy a fém sisak éppen az IA készülék plexicsöve alá kerüljön. Ezt követően a plexicsövön keresztül 2m magasból 450 gramm súlyt ejtettünk a fémsisakra, majd az állatot azonnal visszahelyeztük az altatógépre s 100% O₂-t lélegeztettünk. A fémsisakot eltávolítottuk, s amennyiben a koponya csont nem törött, a sebet öltésekkel egyesítettük, s az állatot a megfelelő túlélési időig lélegeztettük, illetve az altatókeverék újraadagolásával altattuk, vagy – hosszabb túlélés esetén - fokozatosan felébresztettük, és

a perfúziós fixáláshoz pentobarbital intraperitonealis túladagolásával altattuk újra. Azon – igen ritka – eseteket, amelyekben a koponya betört, a további vizsgálatokból kizártuk.

3.2.3. A physiologiai paraméterek monitorizálása

Összhangban más szerzők megfigyeléseivel, vizsgálateink során a temporális izom hőmérsékletének monitorizálásával követtük az agyhőmérséklet – rectalis hőméréssel pedig a maghőmérséklet-változását [24;37;72;152]. A légzést a fülön illetve a talpon elhelyezett pulzus-oximéter segítségével illetve – szelektált esetekben - a femorális arteriából nyert vérgázmintá analízisével ellenőriztük. Ugyancsak válogatott esetekben az arteriás vérnyomást az arteria femoralison keresztül történt véres vérnyomás-méréssel követtük.

3.3. A cyclosporin A bejuttatásának leírása

A cyclosporin A (CsA) fél órával a trauma előtt vagy fél órával azt követően került bejuttatásra intrathecalisan (vide infra) az Okonkwo és Povlishock által leírt módszerrel [122]. Miután az állatot a fenti módon elaltattuk, hasonfekvő helyzetben Kopf kisállat- stereotaxiás készülékben rögzítettük, majd hosszanti bőrmetszés után, erősen hajlított fejhelyzet mellett suboccipitalis feltárásból kerestük fel a membrana atlantooccipitalist. A membránt stereotaxiás mikromanipulátorban rögzített, 25G lumbálpunkciós tűvel átszúrva a cisterna magnából 0.1 ml liquort bocsátottunk le, melynek helyére ugyanilyen volumenű CsA-oldatot juttattunk. A CsA adagja 10 mg/kg (Sandoz Sandimmune Injection Prep; Novartis, Basel, Switzerland), oldószere polyethylene glycol, aqua destillata pro injectione és cremophor olaj keveréke. (A

vívóanyag – kezelésben részesült kontroll állatok kizárólag ezt az oldószerzt kapták.) Az oldat adagolását követően a tíz percig maradt a helyén, ezt követően lassan visszahúztuk, a membránra pillanatragasztóval kis izomdarabot ragasztottunk, előlé spongosztán csikot helyeztünk, s a sebet öltésekkel zártuk.

3.4. A hypothermia leírása

A hypothermiát a Koizumi és Povlishock által publikált metodikának megfelelően végeztük [79] [80;81]. A módszer lényege, hogy a fent leírtaknak megfelelően altatott patkány mag- (rectalis)- és agy- (temporalis) hőmérsékletét az IA-sértülés alkalmazását megelőzően a műtőasztal-fűtés, infralámpák és jégtömlők megfelelő alkalmazásával egyaránt 38°C-ra állítjuk be, majd a sérülést követően azonnal 32°C-ra hűtjük (a terápiás szint elérésének ideje átlagosan 30 perc) majd a fenti eszközök arányos alkalmazásával folyamatosan, 60 percen keresztül ezen a hőfokon tartjuk. A 60. perc, tehát a sérülést követő 90. perc végén kezdődik az állat fokozatos felmelegítése: az infralámpa és a műtőasztal-fűtés teljesítményének fokozása révén a temporalis és a rectalis hőmérsékletet 90 perc alatt a kiindulási értékre, 38°C-ra emeljük. A kontroll állatokban a hőmérsékletet a kísérlet során mindvégig a kezdetben elért 38°C-on tartottuk.

A hypothermia-kísérletben szereplő valamennyi állat esetében, tehát nem csak szelektált esetekben a fent leírt teljes fiziológiai-monitorizálási eszköztárat alkalmaztuk.

3.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok

3.5.1. Perfúziós fixálás

A tervezett túlélési időszak végén az állatokat nátrium-pentobarbitál intraperitoneális túladagolásával elaltattuk, majd thoracotomiás feltárásból az aorta descendens érágóval lefoglattuk, a bal kamrát megnyitottuk, s azon át a felszálló aortába kis fémkanyalt vezetünk, melyen keresztül az állatot a jobb pitvar megnyitását követően nyomás-vezérelt perfúziós módszerrel (90 Hgmm), fiziológias sóoldattal (250 ml) áramoltattuk át, majd – kezdetben gyors (350 ml) ezt követően lassú (250 ml) cseppszámmal - Millonig-féle phosphate pufferban oldott 4% paraformaldehide és 0.1% glutaraldehide keverékével perfundáltuk. Egy órával a perfúziót követően az agyakat eltávolítottuk és ugyanilyen összetételű oldatban, immerziós módszerrel, 16-18 órán át utófixáltuk.

3.5.2. Az agytörzs feldolgozása

Az agytörzs további vizsgálatokra történő feldolgozását elősegítették az IA-modellel nyert korábbi tapasztalatok, melyek alapján a DAI várható anatómiai lokalizációja nagy valószínűséggel kiszámítható volt [80;140]. Ennek megfelelően az immerziós fixálást követően az agyat egy sagittálisan millimeter beosztású barázdáktól szabadalt, fémből készült negatív öntőmintába fektettük s az öntőminta rovátkáiban vezetett metszéssel a középső, 5 mm szélességű blockot, melynek lateralis határa a sulcus parolivaris medialis területén, tehát a medullaris pyramistól oldalra helyezkedett el, az agyból kimetszettük, majd ebből a blockból coronalis síkban vezetett metszésekkel leválasztottuk a pons-tól a felső cervicális segmentumig terjedő részt, s abból vibratómmal [Vibratome Series 1000 (Polysciences Inc., Warrington, PA)], agar támogatással, az aktuális kísérlet tervének megfelelően 30-40 mikrométer vastag sorozat-metszeteket

készítettünk. A metszet-sorozat elrendezése szintén az aktuális kísérleti tervnek megfelelő csoportosításban történt.

3.5.3. Metszetelőkészítés, "antigene- retrieval"

Vizsgálataink során mindvégig szabadon úszó ("free floating") metszeteket használtunk, melyeket a metszést követően phosphate puffer oldatban, majd a nem-specifikus peroxidáz aktivitás elnyomására fél órán át 0.5%-os H_2O_2 oldatban mostunk.

Az immunohisztokémiai jelfelerősítési illetve érzékenység-fokozási technikák közül a Stone és társai által 1997-ben a beta-amyloid precursor protein (APP) immunreaktivitás (IR) kimutatására kidolgozott mikrohullámú antigén-felerősítési ("antigene- retrieval") eljárást használtuk [80;167]. A módszer alapjait korábban Sherriff illetve Gentleman [55;106;153] dolgozta ki az APP kimutatására, ugyanis ezen antigén detektálását jelentősen megkönnyíti a szövet mikrohullámú készülékben történő előkezelése. A fenti jelfelerősítési módozatnak ugyanakkor jelentős hátránya volt, hogy a laboratóriumi mikrohullámú sütőben történő kezelés során fejlődött hő olyan strukturális károsodást okozott a metszetekben, amely az anyag további, elektronmikroszkópos feldolgozását, az ultrastrukturális részletek megjelenítését kizárta.

A Stone és társai által leírt módszert követve, a metszeteket nátrium-citrát pufferbe (pH 6.0) helyeztük, majd egy programozható, magnetronnal működő, 900 watt teljesítményű (PELCO 3460; Ted Pella, Redding, CA) speciális laboratóriumi mikrohullámú készülékbe helyeztük. Ezt, a számítógéppel szabályozott és ellenőrzött, hűtőrendszerrel ellátott mikrohullámú sütőt úgy programoztuk, hogy a citrát pufferben

elhelyezett metszetek 2x5 percig, 70%-os teljesítménnyel kapjanak mikrohullámú energia-csomagot, s hőmérsékletük semmi képpen sem haladja meg a 40°C-ot.

3.5.4. Az antiszérumok jellemzése

A disszertációban ismertetendő vizsgálataink során az alábbi elsődleges (“primary”) antitesteket használtuk.

Az **Ab38** kódszámú antitestet Dr. Robert Siman juttatta rendelkezésünkre. Ezt az antitestet az agyban található struktúrfehérje, a spectrin (fodrin) béta alegysége 150-kDa molekulatömegű lebomlási termékének (“spectrin breakdown product”; SBDP) NH₂-terminális fragmentuma ellen termelték, nyúlban [142;162-164]. Ez a specifikus SBDP kizárólag akkor keletkezik, ha a spectrin molekulát a kalcium által aktivált, calpain nevű enzim bontja, tehát a SBDP-IR kimutatása kizárólagosan jellemző a calpain aktiválódására (“signature protein”). Túl a calpain aktiválódásának jelzésén, a SBDP-IR kimutatása érzékeny, indirect jele a fokális kalcium-akkumulációnak, s mint ilyen, széles körben használt a kalcium indukálta, calpain-mediálta spectrin lebomlás (“calpain-mediated spectrin proteolysis”, CMSP) detektálására [13-17;56;76;87;111;114;115;128;129;131;145;146]. Az antitestet mind Western blot módszerrel, mind kimerítéses, immunhisztokémiai technikával tesztelték, s nemcsak az előállító Dr. Siman és a Cephalon cég, hanem több kutató is igazolta annak nagyfokú specifikusságát [131;142;145;164].

Az **RMO-14** kóddal jelölt, egérben termelt monoclonális antitest, melyet Dr. Trojanovsky bocsátott rendelkezésünkre, mint ezt korábban már említettük, csak akkor kapcsolódik a neurofilament közepes molekulású alegységének (“M-subunit”) tövéhez

(“rod domain”), ha az oldalkarok (“sidearms”) korábban lehasadtak vagy alapvető alakváltozást szenvedtek, s ezáltal a rod domain-epitópok hozzáférhetővé válnak. Mivel az axoneredési dombtól kezdődően a neurofilament oldalkarok döntően magas szinten foszforiláltak, leszámítva csupán a relative alacsony foszforilációs szintet mutató Ranvier befűződéseket (“nodal region”), az RMO-14 antitest normális esetben az axonokban elhelyezkedő neurofilamentumokhoz nem kötődik. Ugyanakkor az immunszérum kötődési képessége illetve az immunhisztokémia specifikussága tekintetében hasznos adat, hogy a neuronok, melyek a neurofilamentumokat foszforilálatlan formában tartalmazták, az RMO-14 antitesttel minden esetben, legalábbis enyhe fokban jelöltté válnak. Az antitest, mint azt a korábbi kísérletek igazolták és a fentiekben jeleztük, alkalmas arra, hogy a DAI kialakulásának korai szakaszában felismerjük azokat a károsodott axonszakaszokat, amelyekben a neurofilament oldalkar-módosulás és cytoszkeletális kompaktalódás folyamata – s a társuló egyéb axolemmalis és axoplasmaticus változások – a későbbiekben az axon duzzadásához és szakadásához, degenerálódásához vezetnek [88;105;121;126;140].

Az APP antitest, mely egér eredetű, monoclonális antiszérum, a Boehringer cég terméke. Felhasználását DAI jelzésében az indokolja, hogy az APP vezikuláris formában, a gyors axoplazmatikus transzport útján szállítódik, s az axoplazmatikus transzport károsodása folytán, ami, mint korábban említettük, a DAI-ban észlelhető cytoszkeletális változások miatt hamar bekövetkezik, az APP korán olyan szintet ér el, amely immunhisztokémiailag kimutatható, különösen a fent leírt antígeno-retrieval módszer alkalmazásával. Az APP és annak immunhisztokémiai kimutatása jelenleg mind a TAI mind pedig a DAI vizsgálatában illetve pathohisztológiai diagnosztikájában a

legelterjedtebb marker illetve metodika [20;21;39;55;57;68;80;106;118;127;153-155;167;179;191].

3.5.5. Felhasznált immunfestési protokollok és kontrollok

1. Táblázat. A vizsgálatokban felhasznált ellenanyagok rövid ismertetése

| Ellenanyag | Cél | Alkalmazás | Másodlagos Antitest, Hígítás |
|------------|--|---------------------------------|--|
| | Kalcium-indukálta, Calpain-mediálta spectrin proteolysis (150-kDa spectrin fragmentum) | Fény - és elektron mikroszkópia | Biotinilált Anti-nyúl (kecskef) 1:400 |
| | Neurofilamentum M-alegység, "rod domain" (cytoszkeletális kompaktálódás) | Fény - és elektron mikroszkópia | Biotinilált Anti-egér, patkány-kimerített (16) 1:400 |
| | Béta-amyloid precursor protein felhalmozódás (axoplazmaikus transzport karosodása) | Fény mikroszkópia | Biotinilált Anti-egér, patkány-kimerített (16) 1:200 |

Az antigén- jelfelerősítésnek a 3.5.3. pontban leírt folyamatával bezárólag az immunhisztokémiai protokollok teljesen megegyezőek voltak, majd phosphate-pufferes mosás illetve - a második szérumszámtermetelési fajtától függően - 10%-os normál ló- vagy normál kecske-szérumszámtermetelési puffer (NHS/PBS vagy NGS/PBS) 0.2% Triton-X-100-at (mind Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tartalmazó oldatban történő 35 perces inkubáció következett. Ez a lépés részben a nem-specifikus antigén-kötés leszorítását (normál szérumszámtermetelés) szolgálja, részben pedig a membránok az antigén általi átjárhatósága növelését szolgálja (detergens). Ezután a megfelelő fajú normál szérumszámtermetelés 1%-os oldatában való rövid

mosás illetve az elsődleges antiszérumban való, 12-16 órás ("overnight") inkubáció következett. Ismételt, normál szérumban való mosás után egy órán keresztül inkubáltuk a metszeteket a biotinilált második antitestnek táblázatban ismertett koncentrációjú oldatában (mind Vector, Burlingame, CA), majd újabb mosás után Vector ABC Elite-kit (Vector, Burlingame, CA) 1:100 oldatával csatoltuk a peroxidase enzimet az immunhisztokémiai reakció-láncba. Az immunkomplexet az így csatolt peroxidase közvetítésével, hydrogen peroxid és diaminobenzidin (mindkettő Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) hozzáadásával tettük láthatóvá, felhasználva, hogy a diaminobenzidine oxidálódása során barna, stabil, elektronenz csapadékot képez.

Miközben a fenti protokoll tükrözi a fény- illetve elektronmikroszkópos egyes jelölés menetét, külön szükséges részleteznünk az Ab38 és RMO-14 antitestek colocalizálására használt különféle kettős jelölési protokollokat.

Míg az immunhisztokémiai repertoár sokféle lehetőséget nyújt különböző antigének egyazon metszetben történő kimutatására sejtesten belül vagy szinaptikus kapcsolatban, addig különböző építékek egyazon axonon belül történő kimutatása számos nehézségbe ütközik. Ilyen feladatra a látszólag leghasználhatóbb metódika a fluorescens kettős jelölés, ám ennek electronmikroszkópos konverziója igen munka- és eszközigényes feladat. A speciális konverziót nem igénylő, elsősorban peroxidase alapú színreakciókkal szintén vannak nehézségek. A munkánk során számos chromogénkombinációval próbálkoztunk megérősíthetjük, hogy a rendkívül körülményes protokollt igénylő, nehezen diffundáló benzidindydrochloride [BDHC, zöldeskék, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)] [29;85;90], mely ugyanakkor igen jól elkülöníthető, vagy a könnyebben diffundáló, ám fénymikroszkópos szinten nehezebben

megkülönböztethető Vector VIP (VVIP, lila) [192]egyaránt alkalmazható akár egymással, akár a diaminobenzidinnel (DAB, barna) párban, két, eltérő epitóp egyazon metszetben történő megjelenítésére és azonosítására.

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

Azokban az esetekben, ahol a BDHC – VVIP chromogén kombinációt alkalmaztuk, a két antigén kimutatása a fentieknek megfelelő szekvenciában történt, azzal a különbséggel, hogy az első immunoreactio, tehát az Ab38 kimutatására a BDHC-ot alkalmaztuk. Ez a protokoll megkövetelte továbbá, hogy a metszeteket 6.5 pH-jú, 0.01M phosphate pufferben mossuk és az előhívási reakció 4 C°-on történjen.

Mindemellett, a BDHC reakciótermékek a további lépések során történő intenzitá-

csökkenését kivédendő, a kettős jelölési folyamat további lépéseit, tehát az RMO-14-ben való inkubálást, illetve az RMO-14-kimutatás VVIP-ben történő előhívásának teljes folyamatát a fenti pufferben és hőfokon végeztük. A VVIP reakció leállítását követően a metszetek további sorsa megegyezett a DAB - VVIP kombináció esetében leírtakkal.

3.5.6. Immun-elektronmikroszkópiai szövETFeldolgozás

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

A Vector VIP –t tartalmazó metszetek esetében a kioldódást elkerülendő a dehidráálás, beágyazás folyamatában a Zhou és Grofova által leírt módszertant alkalmaztuk[66;192].

3.6. Az eredmények feldolgozása

3.6.1. Digitális képrögzítési technika, fotómunka

A tized- vagy századmólos foszfát pufferből lemezzre húzott metszetek dehidrációja és lefedése után a metszeteket egy Sony Catseye digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse 800 photomikroszkóppal elemeztük, a digitális felvételeket Adobe Photoshop 5.0 programmal rögzítettük, a papírképeket Sony printeren nyomtattuk ki.

3.6.2. Quantitatív feldolgozás – képelemzés, statisztika

Az eredmények kvantitatív feldolgozása randomizált, vak módszerrel történt, Olympus BH-2 Microscope, Nikon digitális kamera és a hozzá kapcsolt, számítógépezérelt képelemző rendszer segítségével (Imaging Research, St. Catherine's, Ont. Canada). A kísérletek során kétféle protokollt alkalmaztunk.

A CMSP időbeli lefolyásának elemzésére a decussatio pyramidorum területéről választottunk metszeteket s e területről nyertünk digitális felvételt 20X objectív és 2.5X intermediaer lencse alkalmazásával. A képelemzést egy olyan, 125,000 μm^2 területű négyzögre korlátoztuk, amelynek hossz tengelye a lemniscus medialis lefutásával volt párhuzamos, caudalis, verticalis axisa a decussatio leg-rostralisabb rostjain haladt át, s maga a négyzög egyenlő felszint fedett be mind a medulláris pyramisból mind pedig a LM-ból. E területen belül megjelöltük mindazon immunreaktív axonszegmentumokat, melyeknek bármely átmérője az öt mikrométert meghaladta, majd a jelölt, Ab38-IR axonszakaszokat leszámolva, az Ab38-IR axonok denzitását mint reaktív axon per négyzetmilliméter számoltuk, illetve fejeztük ki, s e denzitás értéket használtuk a további statisztikai számításokhoz. Az így kapott denzitási értékeknek a túlélési idő függvényében történő változását SPSS 7.5 for Windows szoftver alkalmazásával, Scheffe-féle posthoc többváltozós analízissel kiegészített ANOVA segítségével

elemztük, az összehasonlított denzitási értékek közötti szignifikáns különbség határértékét $p < 0.05$ -ben határoztuk meg.

A CsA illetve a hypothermia hatékonyságának meghatározására a kísérleti tervnek megfelelően gyűjtött metszetekről kétféle felvételt digitalizáltunk, az egyik a medulláris pyramis két, szomszédos mezőjéről készült a fenti nagytással, a másik pedig ugyanazon metszetben a cervicomedulláris átmenet területén a fasciculus longitudinalis medialisra centrált 10X-es nagytású objectív, 2.5X-ös intermediaer lencse felhasználásával készült. A medulláris pyramisról készült felvételekben magát az anatómiailag jól elkülönülő pyramist rajzoltuk körül, s abban számoltuk meg az öt mikronnál nagyobb átmérőjű IR axon-profilokat, majd az adott IR-axon-denzitást a fentiekben leírt módon határoztuk meg. A FLM területéről származó felvételek esetében egy – minden esetben azonos alakú - 250,000 μm^2 négyzetet borítottunk a FLM-ra mely négyzög hossz tengelye a pályáéval párhuzamos volt. Az IR-axondenzitást a fent leírt módon határoztuk meg. A kezelt és a kontroll esetek közötti eltérést SPSS 7.5 for Windows szoftver alkalmazásával, Scheffe-féle posthoc többváltozós analízissel kiegészített ANOVA segítségével illetve egyes kísérletek esetén kétmintás T-próba segítségével elemeztük, az összehasonlított denzitási értékek közötti szignifikáns különbség határértékét $p < 0.05$ -ben határoztuk meg.

4. Kísérleteink részletes ismertetése – Eredmények

4.1. Kalcium-indukálta, calpain-mediálta spectrin proteolysis DAI-ban

4.1.1. A kísérlet leírása

Vizsgálatunk célja a kalcium beáramlás-kiváltotta CMSP immunhisztokémiai kimutatásán keresztül annak kiderítése volt, hogy milyen szerepet játszhat pontosan a kalcium kiváltotta strukturális proteolízis a DAI pathogenesisében. Az általános elméleti bevezetőben leírtaknak megfelelően feltételeztük, hogy a koponyasérüléskor ébredő nyíróerők hatására létrejövő kezdeti membránpermeabilitás-változás (axolemmális mechanoporáció) hatására az axonba kalcium áramlik, mely a CMSP aktiválódásához és következményes cytoszkeletális fehérje-emésztődéshez vezet. Mint azt korábban szintén leírtuk, arra számítottunk, hogy egy azonnali, kontrollálatlan fehérje-emésztés helyett a CMSP-IR fokozatosan aktiválódik, s ennek megfelelően mind az immunhisztokémiaiilag detektálható axonok mennyisége mind pedig az egyes axonokon belüli ultrastrukturális folyamatok időben progressziót mutatnak.

A vizsgálatok fontos részét képezte annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a kalcium-indukálta CMSP immunhisztokémiaiilag valóban colocalizálható-e a DAI-ban korábban leírt klasszikus markerekkel, azaz a CMSP és a DAI megjelenése és progressziója térben és időben összekapcsolhatók-e.

A vizsgálatokat összesen 24 patkányon végeztük: IA-sérülést alkalmaztunk 15, 30, 60 és 120 perc túlélési idővel, túlélési időnként 6 állatot operáltunk, ebből 1-1 nem-sértett kontroll volt ("sham control"). A szövetfeldolgozás az általános metodikai fejezetben leírtaknak megfelelően zajlott, a sorozat-metszeteket hat csoportba gyűjtöttük ("semi-serial sections"), Ab38 egyesjelölést alkalmaztunk fény- illetve electron

mikroszkópiára (egyes és kettes csoport), RMO-14 egyesjelölést fény-és electron mikroszkópiára (hármás és négyes csoport) és a korábban részletezett módon, kétféle peroxidase alapú színreakcióval előhívott Ab38-RMO-14 jelölt metszeteket dolgoztunk fel fény- (ötös csoport) és electron mikroszkópiára (hatos csoport). Az egyes és hármás csoportból retrospective minden olyan metszetet, amely a pyramispálya keresztveződését tartalmazta, a metodikai fejezetben leírt módon quantitativ elemzésnek is alávetettünk.

4.1.2. Eredmények

E jól karakterizált és széles körben használt impakt-akcelerációs TBI modellt alkalmazva sikerült kimutatnunk a kalcium indukálta cysteine proteáz, a calpain aktiválódását -annak spectrin-hasító tulajdonságát felhasználva- a patkány corticospinalis pályája pyramidalis szakaszán továbbá a lemniscus medialisban és a fasciculus longitudinalis medialisban[27] (3. ábra).

Túl azon, hogy e vizsgálatok elsőként igazolták a calpain-mediálta spectrin proteolízis jelenlétét (CMSP) TAI-ban, mind a fény-, mind pedig az elektronmikroszkópos megfigyeléseink újszerűek voltak a fent ismertetett klasszikus kalcium hypothesis tükrében. Szemben a korábbi elképzelésekkel azt találtuk, hogy a kalcium-indukálta proteolízis aktiválódása időben elnyújtott folyamat: a sérülés utáni 15 perctől 120 percig vizsgálva az immunpozitiv axonok számának fokozatos emelkedését találtuk, a 15 és 60 illetve a 30 és 120 perces értékek között szignifikáns különbséget észleltünk ($p < 0.05$).

Míg a traumát követő korai időpontokban a reactiv axonok morfológiailag kevésbé változtak (15 perc után mindössze minialis duzzadást és vacuolizációt mutattak s



3. Ábra. A: Calpain-mediálta spectrin-proteolysis immunreaktív (CMSP-IR) axonszegmentumok a FLM területén tizenöt perccel zárt koponyatrauma után. A károsodott, reaktív axonszakaszok (*nyilakkal* jelölve) minimális duzzadást mutatnak, folytonosságuk is többé-kevésbé követhető. B: Két órával a trauma után a – *nyilakkal* jelölt – CMSP-IR axonszakaszok egyértelmű morfológiai változást mutatnak: jelentősen duzzadtak, szegmentálódtak, folytonosságuk megszakadt. A kép felső sarkában az axonális retrakciós ballon képződésének végső fázisa, a ballon lefűződése is jól kivehető. A két képet összehasonlítva látható, hogy a CMSP-IR axonok denzitása a trauma után időben növekedést mutat. (Jel: 20µm).

30 perc után is csupán a vacuolizáció kifejezetté válása volt jellemző (3.A. ábra), addig a 60-120 perces időintervallumban mind több erősen duzzadt, helyenként lefűződő, megszakadó profilt találtunk (3.B. ábra); mindez jól mutatta a DAI progresszióját a CMSP-IR axonszakaszokban.

Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok további, a kalcium-aktiválta proteolyticus folyamatokról vallott korábbi nézetek tükrében ugyancsak meglepő adatokat eredményeztek; míg 15 perccel a trauma után az immunreactív csapadék csaknem kizárólag az axolemma alatt, a subaxolemmalis compartmentben tárolódott, s mindössze csekély electronenz diaminbenzidine (DAB) csapadék volt megfigyelhető az axoplazmában, ott is elsősorban a duzzadt mitochondriumok felszínén (4. ábra), addig 30-60 perc után fokozatosan emelkedett az axoplazmában található csapadék mennyisége, s 120 perc után rendszerint a teljes axoplasmát kitöltötte, nem téve immár lehetővé a CMSP-IR compartmentális elhatárolását (5. és 6. ábra).

Fény- és elektronmikroszkópos kettős jelölési technikák alkalmazásával a TAI jelenleg ismert legérzékenyebb immuncitokémiai markerének, a neurofilament oldalkarmódosulásán alapuló cytoskeletális kompaktalódást ("neurofilament compaction", NFC) kimutató RMO-14 antitestnek és a CMSP markerének (Ab38) eloszlását összehasonlítva még inkább nyilvánvaló lett, hogy a calpain-mediálta spectrin proteolysis kiemelkedő szerepet játszik a DAI pathogenesisében (5.B. és C. valamint 7. ábra). Mind BDHC és VVIP mind pedig DAB és a VVIP chromogének kombinálásával egyértelműen igazoltuk, hogy a CMSP és a NFC jelensége a vizsgált időtartamban (a trauma utáni 15-120 perc) a károsodott axonszakaszban colocalizált. Ez a felismerés további hitelt adott azoknak a megfigyeléseinknek, hogy a CMSP jelenségét mutató



4. Ábra. A: CMSP-IR axonszakasz elektronmikroszkópos képe tizenöt perccel a trauma után. Az elektronenz DAB csapadék zömében a subaxolemmális kompartmentben található *(nyílak)*. A *fehér csillagok* a cytoskeleton kompaktalódását jelzik, míg a *fekete csillagok* a környezetben található ép axonokat mutatják, felhívva a figyelmet a sérülés diffúz természetére. Jól kivehető a myelin-hüvely károsodása *(M)*. B: Nagyobb nagyítási felvételen a fenti, a DAI-ra jellemző ultrastrukturális jelek mellett a mitochondriális duzzadás is jól látható *(kettős nyíl)*. (Jel: 500nm).



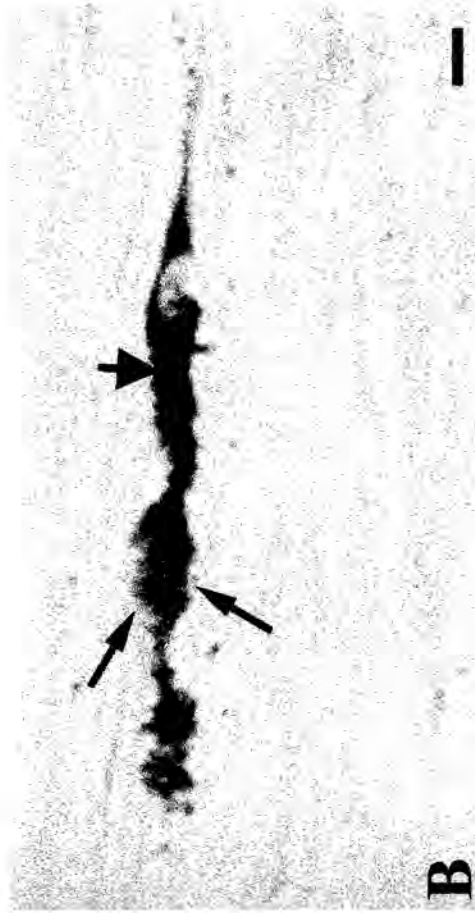
5. Ábra. Károsodott axonszakaszok a corticospinális pálya medulláris szakaszából 30 perccel zárt koponyasérülés előidézését követően. **A:** Kontrasztosítás nélkül készült ultravékony metszeten látható CMSP-IR axonszakasz elektronmikroszkópos képe. Az elektronrendez DAB-csapadék elsősorban a subaxolemmális kompartmentben található (*nyílak*). Kisfokú calpain-mediálta strukturális proteolízis látható az axoplazmában is, elsősorban a károsodott, duzzadt mitochondriumok felszínével asszociáltan (*M*). **B-C:** Kettősen jelölt axonszakaszok, melyekben a CMSP markere (Ab38) diaminobenzidinnel [összefüggő, 200-300nm-es elektronrendez csapadék], míg a neurofilament oldalkarmódosulás és kompaktalódás markere (RMO-14) Vector VIP-vel [kis, kerek, 50-120 nm-es elektronrendez "képlet"] került kimutatásra. A subaxolemmális CMSP-t *nyílak*, az intraaxonális (axoplazmatikus) spectrin-lebomlást *üres nyílak*, a VVIP-csapadékot *nyílhegyek* jelzik. Ismét megfigyelhető az intraaxonális CMSP és egy károsodott, eltűnt krisztájú mitochondrium kapcsolata (*m*) illetve a myelin-hüvely fellazulása (*M*). (Jel: 500nm).



6. Ábra. Károsodott axonszakaszok a FLM-ből 60 perccel zárt koponyasérülést követően. A: Kontrasztosítás nélkül készült ultravékony metszet, CMSP-IR axonszakasz elektronmikroszkópos képe. Az elektronrendz DAB csapadék immár csaknem egyneműen befedi a károsodott-compactálódott cytoszkeletális elemek felszínét (*fehér csillagok*). A környezetben található ép, reakzív, jelöletlen axont *fekete csillag* jelöli. B: Ez az elektronmikroszkópos felvétel olyan axonszakaszról készült, ahol disztálisan a CMSP elfedi a – részben nyilván megemészített, károsodott cytoszkeletális elemeket – (*fehér csillagok*), miközben proximálisan az axoplazmatikus transzport manifeszt zavara, organelum-akkumuláció (*nyílak*) és a cytoszkeleton kompaktálódása (*fekete csillag*) észlelhető. (Jel: 1 µm).



A



B



C

7. Ábra. Károsodott, kettősen jelölt axonok a corticospinális pálya medulláris szakaszából (A és C) valamint a FLM területéről (B). **A:** Tizenöt perccel a trauma után enyhe axonduzzadás látható, az axon folytonossága megtartott. A CMSP-t (Ab38) kékeszöld BDHC (*nyílak*), a NFC-t (RMO-14) lilás VVIP csapadék jelöli (*nyílhegyek*). **B:** Harminc perc után kifejezettebb duzzadás és vakuolizáció figyelhető meg. A CMSP-t (Ab38) ezúttal liláskék VVIP (*nyílak*), a NFC-t (RMO-14) vörösesbarna DAB csapadék jelöli (*rövid nyíl*) [érdemes megjegyezni, hogy a két festés kombinálása mennyire eltérő háttér-árnyalathoz vezet]. **C:** Két órával a trauma után egy kettősen jelölt axonszakasz folytonosságának megszakadása látható. A CMSP-t (Ab38) ezúttal kékeszöld BDHC (*nyíl*), a NFC-t (RMO-14) barnás DAB csapadék jelöli (*nyílhegy*). (Jel: 5 μ m).

axonszakaszokban az axonális károsodás klasszikus jeleit, azaz mitochondriális duzzadást, neurofilament kompaktálódást, a mikrotubulusok számának csökkenését, a myelin hüvely fellazulását és periaxolemmalis terek képződését találtuk (5.B. és C.ábra). A kettősen jelölt axonszakaszokban a túlélési idő függvényében a CMSP-IR ugyanolyan compartmentalizálódást mutatott, mint azt fentebb az egyes jelölés ultrastrukturális elemzése kapcsán már részleteztük.

4.1.3. Következtetések

Megfigyeléseink értelmezéséhez és azok pathophysiologiai jelentősége felismeréséhez a spectrin szerepére kell emlékeztetni. Figyelembe véve a fent leírtakat illetve a Povlishock-munkacsoport korábban említett, a sérült axonszakasz membránpermeabilitás-változására vonatkozó megfigyeléseit, továbbá azt a megfigyelésünket, hogy a TAI során a CMSP egyértelműen a traumától eltelt időtől függő compartmentalizációt mutatott, az alábbi elméletet alkottuk meg.

A trauma-kiváltotta axonális feszülés hatására kalcium áramlik a vongalódásnak - alaki adottsága és/vagy lefutása alapján - kitett axonszakaszba. A kalcium-indukálta fehérjelebomlás limitált, kezdetben a subaxolemmalis kompartmentre korlátozott. Mindez jól megfelel a calpain aktiválódásáról valott jelenlegi biokémiai felfogásnak, azaz a calpain aktiválódása egy membrán-phospholipid-kapcsolt folyamat, amelynek szerves része a calpain translocatioja a membránra.

Ezen kalcium-indukálta subaxolemmális fehérjebontás az integráns membránfehérjékhez ankyrinen keresztül illetve közvetlenül is kapcsolódó spectrin-váz lebontása következtében destabilizálja az axolemmát, a kalcium beáramlása immár

kiterjedt intraaxonális proteolízist indukál s az axon károsodása visszafordíthatatlanná válik (8. ábra).

A kalcium hatására aktiválódó calcineurin-okozta neurofilament oldalkar-defoszforilálódás és a calpain okozta proteolitikus oldalkar-módosulás együttesen a neurofilamentumok közti távolságot fenntartó ionkölcsonhatások megváltozásához és ezen keresztül a neurofilamentek compactálódásához vezet. A beáramló kalcium ugyanakkor közvetlenül felelős a mikrotubulusok számának csökkenéséért.

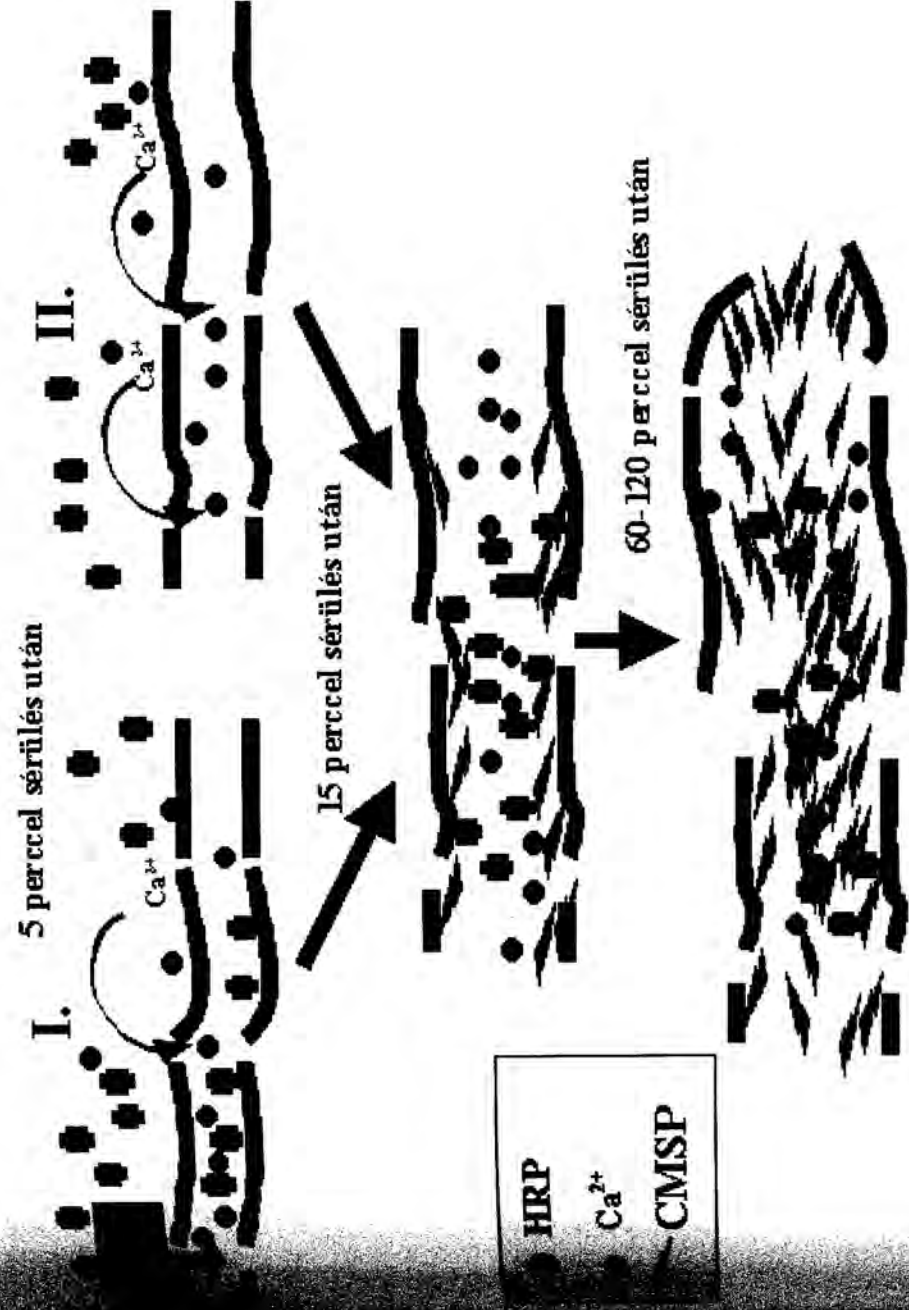
A fokozott kalcium-beáramlás hatására kialakuló mitochondriális károsodás pathobiológiai jelentőségével lentebb foglalkozunk, itt megjegyezzük, hogy a mitochondriális lézió az ionpumpa-működés hátráltatása, az axonális energia-homeosztázis zavara következtében tovább gerjeszti a divalens kation-beáramlás indukálta pathológiás fokú fehérjeemésztést (9. ábra).

Mindezen, viszonylag kismértékű cytoskeletális változások mellé a túlélési időtől függően egyre nagyobb fokú, az axoplazma egészére kiterjedő CMSP jön létre, amely a cytoszkeleton destruálódásához, a mitochondriális permeabilitási pórus direct, proteolitikus-úton történő kinyitásához és az axonális transzportfolyamatok összeomlásán keresztül organellum akkumulációhoz, az axon focalis duzzadásához és kettészakadásához vezet.

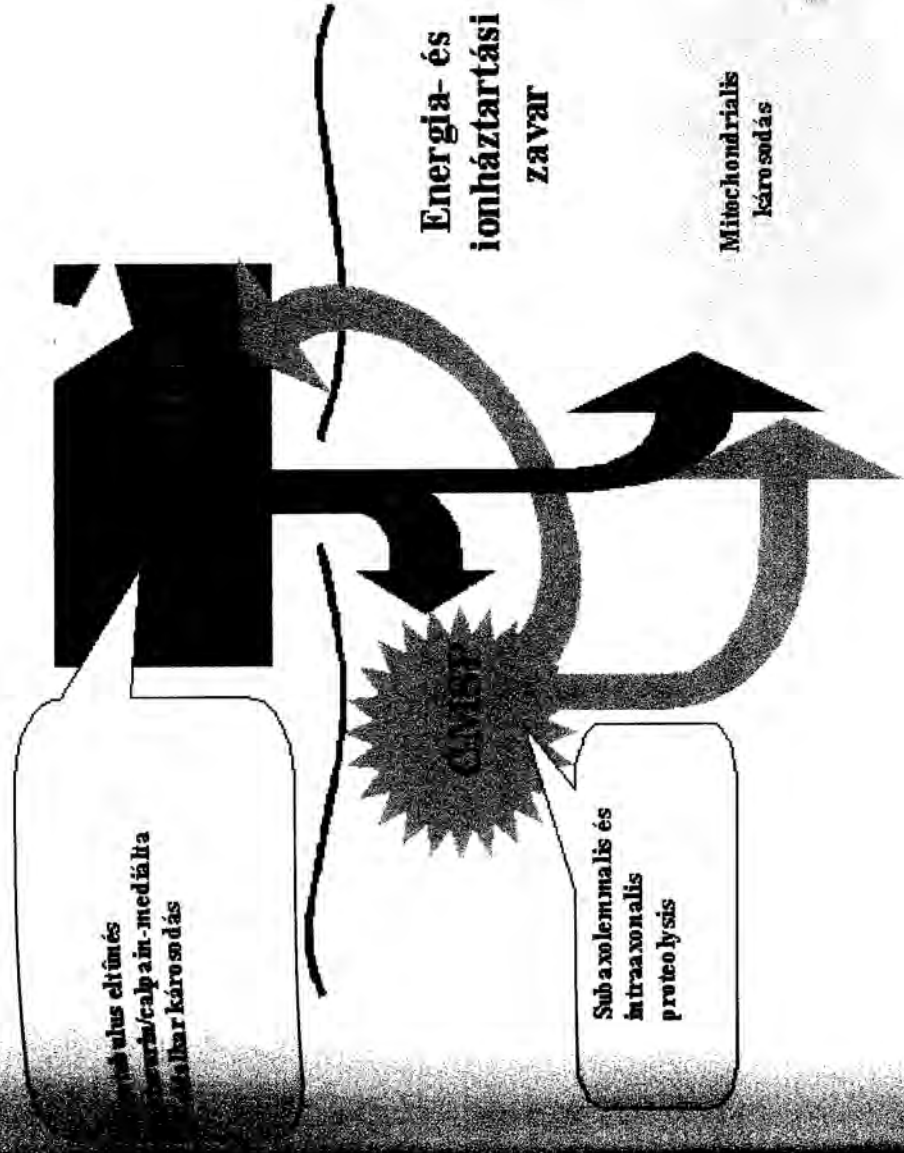
4.2. A cyclosporin A előkezelés hatásának vizsgálata DAI-ban

4.2.1. A kísérlet leírása

Okonkwo és társai igazolták, hogy a CsA-előkezelés (intraciszternális injectio 30 perccel a trauma előtt adva) szignifikánsan csökkenti a DAI során kialakuló



8. ábra. A diffúz axonális károsodás során észlelt membrán-permeabilitás változás, a kalcium beáramlás és a calpain-mediálta spectrin-proteolysis összefüggése. A korai posttraumás szakban az axon vongalódása okozta mechanoporiáció hatására kalcium (és a permeabilitási zavar mértékétől függően HRP is) juthat az érintett axonszakaszba, mely idővel subaxolemmalis CMSP révén további permeabilitási változásokat s így a CMSP generalizálódását indukálja.



9. ábra. A kalcium-beáramlás közvetlen és közvetett (calpain-mediálta spectrin-proteolysisen illetve mitochondriális károsodáson keresztül kifejtett) hatásainak összességére. A kezdeti kalcium-beáramlást a mechanoporáció váltja ki (ld. 8. ábra), amintől a folyamat könnyen „öngerjesztővé” válik.

mitochondriális sérülést [122]és egyúttal, az amyloid precursor protein, mint az axoplazmatikus transzport zavarának markere kimutatása révén azt is bebizonyították, hogy ez a protektív hatás az axoplazmatikus transzport integritásának fenntartásában is megnyilvánul. Figyelembe véve első kísérletünk eredményeit [27], célkitűzésünk az volt, hogy a CsA alkalmazásán keresztül fényt derítsünk a mitochondriális károsodás és a CMSP pathobiológiai kapcsolatára, és további adatokat nyerjünk a CMSP-nek a DAI pathogenesisében betöltött szerepével kapcsolatban.

Munkahypotesisünk az volt, hogy amennyiben a CsA a mitochondriális permeabilitási pórus kinyílásának megakadályozása révén képes a mitochondrium integritásának és működőképességének megőrzésére, s ezáltal az axonális energia- és ionhomeostasis kisiklásának korrekciójára, a CsA-kezelésnek ugyancsak csökkentenie kell a trauma-kiváltotta kalcium-beáramlás által indukálta CMSP-t is. A CMSP-nek a DAI-ban játszott szerepével kapcsolatban tett megfigyeléseink alapján feltételeztük, hogy a CMSP-nek a CsA-előkezelés által kiváltott potenciális gátlása következményeként az axonális cytoszkeletonban bekövetkező elváltozások, így a neurofilamentumok compactálódásának mértéke is csökken, s ennek folyományaként az RMO-14-IR is kisebb mértékű lesz a CsA- kezelt állatokban.

Az általános metodikai szakaszban leírtaknak megfelelően 5 állatban 10 mg/kg dosisban, harminc perccel a trauma előtt intracisternalisan adott CsA-nak a diffuse axonális károsodás kialakulására gyakorolt hatását hasonlítottuk össze 5, ugyanilyen körülmények között vivőanyag-kezelésben részesült állatnál kialakult axonkárosodással.

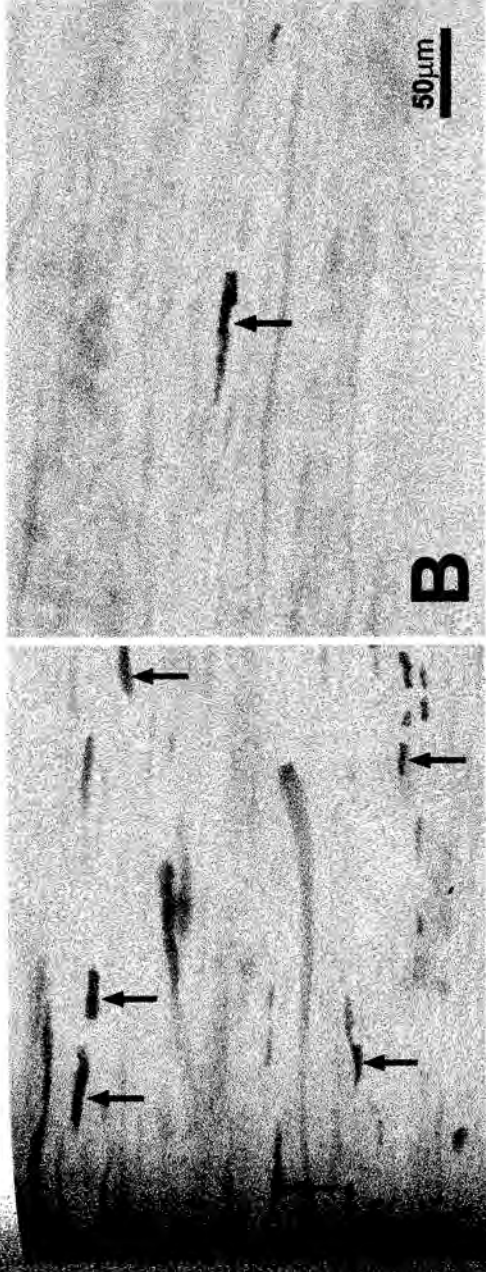
A túlélési idő egy óra, a vizsgált immunhisztokémiai markerek a CMSP-t megjelenítő Ab38, illetve a neurofilamentumok oldalkar-módosulás kiváltotta kompaktalódását kimutató RMO-14 voltak.

Eredményeinket az általános metodikai szakaszban leírtaknak megfelelően, fénymikroszkópos szinten kvalitatív analízisnek vetettük alá, illetve a digitális képköztetés és képelemzés fentebb leírt módszereit alkalmazva quantitative is kiértékeljük.

4.2.2. Eredmények

Harminc perccel az impakt-accelerációs sérülés előtt a cisterna magna-ba adott CsA és vehiculum hatását egy órával a sérülés után vizsgálva, azt találtuk, hogy a DAI-nak leginkább kitett axonkötegekben, a corticospinalis pálya medullaris szakaszán illetve a pyramis caudalis határán, a fasciculus longitudinalis medialisban mind az Ab38 mind pedig az RMO-14 antitest alkalmazásával nagyszámú, diffúsan elhelyezkedő, focialisan károsodott immunreaktív axonszegmens volt megfigyelhető [120] (10. ábra). Ezen axonszakaszok morfológiai tulajdonságai mindkét antitest esetében rendkívül hasonlóak voltak. Összhangban a korábbi fejezetben az Ab38-RMO-14 kettősjelölésre vonatkozóan leírtakkal, mind a CMSP-IR, mind pedig a NFC-IR, azaz az Ab38-IR illetve az RMO-14-IR axonszegmensek duzzadtak, vacuolizáltak voltak, az axon fenyegető kettőszakadásának jelei több esetben jól kivehetően ábrázolódtak.

Már a kvalitatív immunhisztokémiai vizsgálatok egyértelműen jelezték, hogy a vehiculum-kezelt állatokhoz képest a CsA-kezelést kapott patkányokban a károsodott, immunreaktív axonok denzitása jelentősen csökkent (10. ábra), s mindezt a –



1. kép



2. kép

10. ábra. 1. kép: Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív axonok a FLM területén egy órával zárt koponyasérülés után, vivőanyag (elő-)kezelt kontroll állatban (A) illetve 30 perccel a trauma előtt CsA-kezelést kapott patkányban (B) **2. kép:** Neurofilament kompaktalódást mutató, RMO-14-immunreaktív axonok a TCSp területén egy órával zárt koponyasérülés után vivőanyag kezelt kontroll állatban (A) illetve CsA-kezelést kapott patkányban (B). Mindkét anatómiai régió illetve immunhisztokémiai marker esetében szembetűnően csökkent a károsodott, reaktív axonok denzitása a trauma előtt harminc perccel intrathecalis CsA-kezelésben részesült állatokban.

természetesen vak módszerekkel kivitelezett - kvantitatív vizsgálatok eredményei is alátámasztották.

Statisztikai vizsgálataink (kétmintás t-próba) igazolták, hogy a harminc perccel a trauma előtt 10 mg/kg dosisban intracisternalisan adott CsA $706.83 \pm 21.03_{Ab38IR}$ (mean \pm sem) értékről (vehiculum kezelés) $207.19 \pm 12.96_{Ab38IR}$ csökkentette az Ab38 immunreaktív axonok átlag-denzitását a TCSp területén ($p < 0.001$ ($t = 8.33$, $df = 8$)). Ugyancsak szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az RMO-14 immunreaktív axonok TCSp-beli átlagdenzitálásában, $756.29 \pm 17.90_{RMO14IR}$ -ről $176.26 \pm 18.93_{RMO14IR}$ -ra csökkent az érték a CsA kezelt csoportban ($p < 0.001$ ($t = 8.47$, $df = 8$)). A FLM területén szintén szignifikáns csökkenést kaptunk: $133.40 \pm 6.42_{Ab38IR}$ -ról $44.00 \pm 1.62_{Ab38IR}$ -ra ($t = 7.07$, $df = 8$, $p < 0.001$) illetve $149.91 \pm 6.76_{RMO14IR}$ -ről $46.61 \pm 1.91_{RMO14IR}$ -ra ($t = 8.25$, $df = 8$, $p = 0.001$).

4.2.3. Következtetések

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a CsA trauma-előtt történő intrathecalis alkalmazása szignifikáns védelmet biztosít a DAI kialakulása ellen. Korábbi vizsgálatok eredményeként azt tudtuk, hogy a CsA nyújtotta mitochondriális védelem hatásaként az axoplasmaticus transport zavara szignifikánsan kisebb lesz IA-sérülés kiváltotta DAI-ban [122], ennek háttérében most kísérletünkkel egyértelműen igazoltuk az axonális cytoskeleton posttraumás morfológiai elváltozásainak mérséklődését a CsA hatására (szignifikánsan csökkent RMO-IR). Az a megfigyelés, hogy a CsA nyújtotta axonális protekció együtt jár a CMSP csökkenésével, részben igazolni látszik azt az elméletünket, hogy a mitochondrium működőképességének megőrzésével, az axonális energia-háztartás

rendezésével, az ionpumpák működőképességének fenntartásával kivédhető lehet a kalcium túlzott beáramlása és az intraaxonális felgyülemzése által kiváltott, calpain-mediálta axonális fehérjelebomlás.

Talán nem túlzás a calpain-mediálta spectrin proteolízisnek a traumás eredetű axonkárosodás kórfolyamatában betöltött jelentős pathogenetikai szerepére következtetni abból a megfigyelésből, hogy a CMSP-IR axonok denzitásának CsA kezelést követő szignifikáns csökkenésével párhuzamosan a neurofilamentumok oldalkar-módosulása által kiváltott RMO-14-IR is szignifikáns csökkenést mutatott.

Mindezen adatok alapján feltételeztük, hogy a CsA olyan potenciális axonális védelmet biztosító szer, amelynek helye lehet a DAI (kísérletes-) terápiájában.

4.3. A trauma után alkalmazott Cyclosporin A- kezelés hatása DAI-ban

4.3.1. A kísérlet leírása

Miután a CsA-nak a DAI kezelésében betöltött lehetséges szerepét a fenti vizsgálatok felvetették, alapvető fontosságúnak tartottuk annak a kérdésnek a vizsgálatát, hogy a neuroprotectív hatás észlelhető-e a klinikai helyzethez sokkal inkább hasonló körülmények között; azaz a trauma *után* alkalmazott CsA kezelést követően is megfigyelhető-e a fent tapasztalt kedvező hatás, ami - ha beigazolódnik - komoly reményekre adhat okot a klinikai alkalmazás tekintetében. (Habár anekdotikus közlés a trauma *előtt* alkalmazott CsA-kezelés jótékony hatásairól időközben megjelent [59], arra vonatkozóan semminemű adat nem állt rendelkezésünkre, hogy milyen hosszú lehet a CsA terápiás hatására vonatkozó "therápiás ablak".)

Kísérletünk tervezése az előbbieken ismertett CsA-kisérletről annyiban tért el, hogy a cisternális CsA illetve vehiculum beadásra fél órával a trauma után került sor. Hogy a CsA behatási ideje az előző kísérletben leírtaknak megfelelően, azaz másfél óra legyen, ezúttal két órával a sérülés után vizsgáltuk qualitative és quantitative a fent leírt immunhisztokémiai markereknek a károsodott axonokban való megjelenését.

Ahhoz, hogy az eredményekből további következtetéseket vonjunk le, annak megállapítását is szükségesnek láttuk, hogy a posotraumas CsA-kezelés feltételezett pozitív hatása nem csak átmeneti, hanem a sérülést követően 30 perccel alkalmazott CsA-kezelés az axonális károsodással szemben elnyújtott protektív hatást biztosít. Ennek megítélésére a kísérletsorozatot (posotraumas CsA kezelés) kiegészítettük a béta amyloid precuzor protein (APP) immuncitokémiai kimutatásával 24 óras túlélést követően (újabb 5 állat kapott CsA-, 5 pedig vehiculum-kezelést 30 perccel a traumát követően).

Mint azt korábban részletesen leírtuk, az APP - mint transportprotein - érzékeny markere a TAI során kialakuló axoplazmatikus transport-károsodásnak; felhalmozódása előrevetíti az axon kettészakadását, axonális retraktiós ballon képződését és 24 órával a trauma után pontosan jelzi az axon-ruptura helyét.

4.3.2. Eredmények

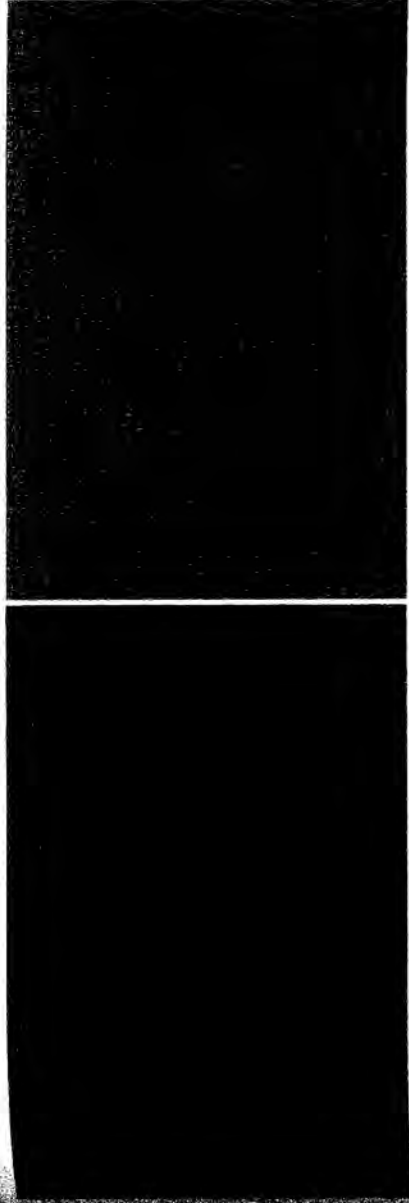
Az eredmények fénymikroszkópos immunhisztokémiai kiértékelése igazolta, hogy a harminc perccel az impakt-accelerációs sérülés után a cisterna magnába történő CsA és vehiculum beadást követően, két órával a sérülés után vizsgálva a patkány agytörzset, ismét a DAI-nak leginkább kitett axonkötégekben, a corticospinalis pálya

medullaris szakaszán illetve a pyramis caudalis határán, a fasciculus longitudinalis medialisban voltak megtalálhatók Ab38- illetve RMO-14-IR axonszegmensek [26].

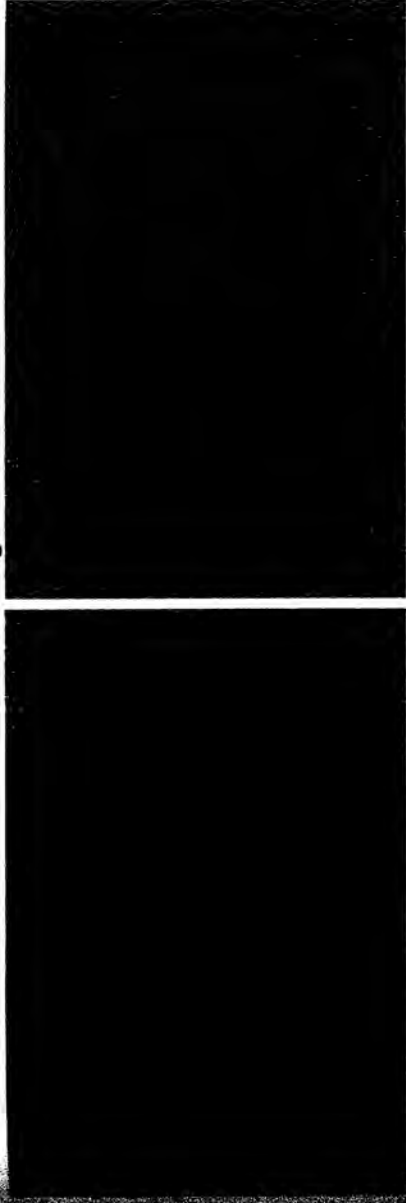
A károsodott, immunreaktív axonszakaszok morfológiai megjelenése mindkét immunhisztokémiai marker esetében messzemenően hasonló (**11. ábra 1. és 2. kép**): a traumát követő két óras túlélésnél megszokottaknak megfelelően nagyfokú duzzadás, előrehaladott vacuolizáció, lefűződés, sok esetben az érintett axonszakasz kettészakadása figyelhető meg, időnként jól kivehetők az immunreaktív axonális retrakciós ballonok (**11. ábra, 1. kép**).

Statisztikai vizsgálataink (kétmintás t-próba) igazolták, hogy a harminc perccel a trauma után 10 mg/kg dosisban intracisternalisan adott CsA $1114.00 \pm 226.01_{Ab38IR}$ (mean \pm sem) értékről (vehiculum kezelés) $417.29 \pm 63.66_{Ab38IR}$ -ra csökkentette az Ab38 immunreaktív axonok átlag-denzitását a TCSp területén ($t=3.26$, $df=10$, $p<0.01$). Ugyancsak szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az RMO-14 immunreaktív axonok TCSp -beli átlagdenzitásában, $1158.03 \pm 270.32_{RMO14IR}$ -ról $393.34 \pm 64.90_{RMO14IR}$ -ra csökkent az érték a CsA kezelt csoportban ($t=3.447$, $df=10$, $p<0.01$). A FLM területén szintén szignifikáns csökkenést kaptunk: $189.90 \pm 24.61_{Ab38IR}$ -ról $50.26 \pm 5.95_{Ab38IR}$ -ra ($t=6.467$, $df=10$, $p<0.001$) illetve $194.93 \pm 44.53_{RMO14IR}$ -ről $47.68 \pm 4.05_{RMO14IR}$ ($t=3.293$, $df=10$, $p<0.03$) (**12. A. és B. ábra**).

Akárcsak a korai posttraumás időszakban vizsgált másik két marker esetében, az APP ICC vizsgálata során is szembeötlő volt az immunreaktív axonszakaszok számának csökkenése (**11. ábra, 3.kép**). Ugyanakkor az érintett axonszegmensek között több volt az erősen duzzadt, helyenként vacuolizált, lefűződött, folytonosságát elvesztett



1. kép

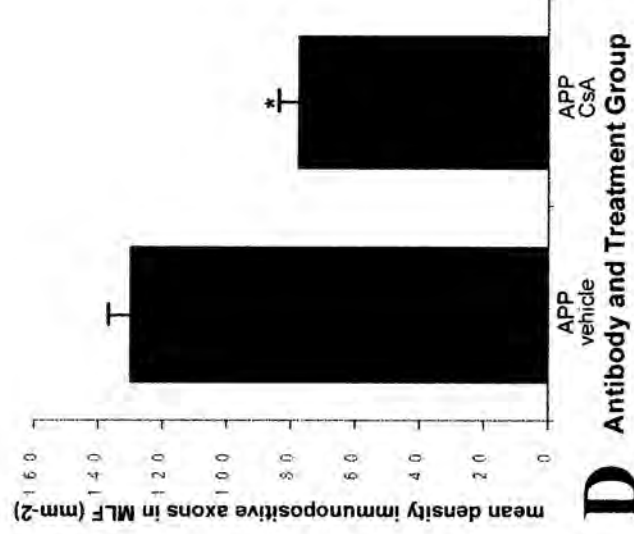
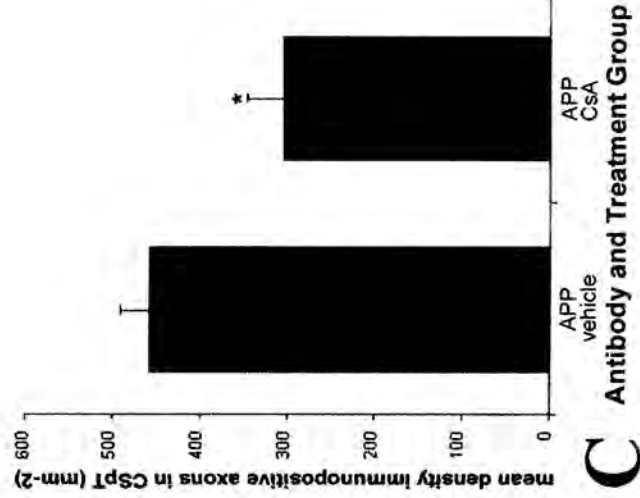
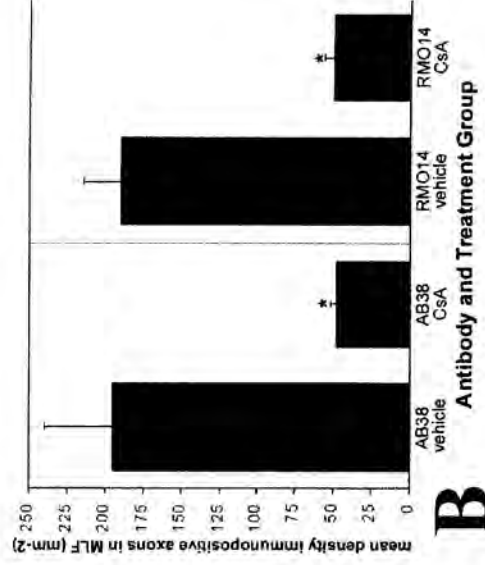
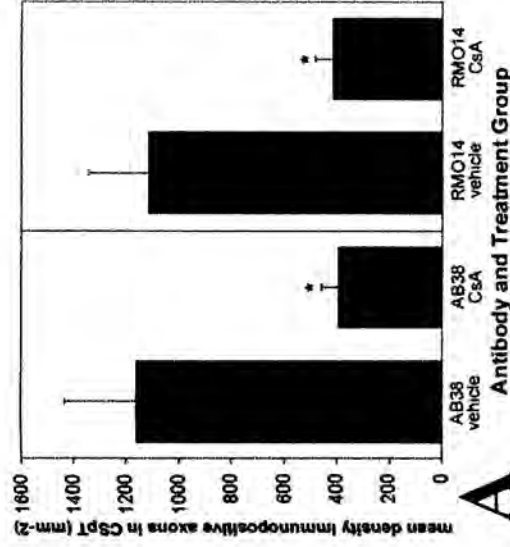


2. kép



3. kép

11. ábra. 1. kép: Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív axonok a FLM területén másfél órával zárt koponyasérülés után, vivőanyag (utó-)kezelt kontroll állatban **(A)** illetve 30 perccel a trauma után CsA-kezelést kapott patkányban **(B)**. **2. kép:** Neurofilament kompaktalódást mutató, RMO-14-immunreaktív axonok a TCSp területén másfél órával zárt koponyasérülés után vivőanyag kezelt kontroll állatban **(A)** illetve CsA-kezelést kapott patkányban **(B)**. **3. kép:** Béta amyloid prekursor protein-immunreaktív axonok a TCSp területén 24 órával zárt koponyasérülés után vivőanyag kezelt kontroll állatban **(A)** illetve CsA-kezelést kapott patkányban **(B)**. Mindkét anatómiai régió illetve mindhárom immunhisztokémiai marker esetében szembevetődően csökkent a károsodott, reaktív axonok denzitása a traumát követően harminc perccel intrathecalis CsA-kezelésben részesült állatokban.



12. ábra. Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív, illetve neurofilament kompaktálódást mutató, RMO-14-immunreaktív, sérült axonok átlagos denzitásának (axonszám/mm²) összehasonlítása a TCSp (A) és a FLM (B) területén másfél órával zárt koponyasérülés után, vivőanyag (utó-)kezelt kontroll állatban (*vehicle*) és C5A-kezelést kapott patkányban (C5A). Béta amyloid prekursor protein-immunreaktív, sérült axonok átlagos denzitásának (axonszám/mm²) összehasonlítása a TCSp (C) és a FLM (D) területén 24 órával zárt koponyasérülés után, vivőanyag (utó-)kezelt kontroll állatban (*vehicle*) és C5A-kezelést kapott patkányban (C5A). Az oszlopdiagrammok tetején elhelyezett *vonalka* a „standard errort („sem”)”, a *csillag* a szignifikáns különbséget jelzi. A C5A szignifikáns protektív hatása szembeötlő.

axonszakasz, azaz magasabb volt az immunoreaktív axonális retractsio ballonok aránya ki.

Statisztikai vizsgálatok (kétmintás t-próba) szintén igazolták a CsA neuroprotectív hatásának tartósságát: a TCSp területén az APP immunreaktív axonok átlagdenzitása $457.45 \pm 32.51_{\text{APP-IR}}$ -ről $302.97 \pm 42.69_{\text{APP-IR}}$ -ra illetve a FLM területén $129.65 \pm 16.16_{\text{APP-IR}}$ -ről $77.46 \pm 15.42_{\text{APP-IR}}$ -re csökkent a CsA-kezelt csoportban ($t=2.77$, $df=9$, $p<0.03$ illetve $t=5.471$, $df=9$, $p<0.001$) (12. C. és D. ábra).

4.3.3. Következtetések

Vizsgálatunk igazolta, hogy nemcsak a trauma előtti CsA-kezelés biztosít szignifikáns védelmet a DAI kialakulása ellen. Annak ellenére ugyan, hogy a hosszabb túlélési idő (kettő óra szemben a korábban alkalmazott egy órával) a károsodott axonok denzitásának növekedésében nyilvánult meg mind a trauma után 30 perccel CsA-kezelt mind pedig a vehiculum- kezelt csoportban, a neuroprotectív hatás *mértéke és szignifikáns volta* gyakorlatilag nem változott. Ugyancsak bizonyítottuk, hogy a trauma utáni CsA kezelés tartós axonális protekciót eredményez, hiszen az APP-IR (és) elszakadt axonok denzitása 24 órával a trauma után is jelentős csökkenést mutatott. Bár az APP-IR axonszakaszok denzitásának vizsgálata során kapott értékek jelentősen alatta maradtak a két korai marker (Ab38, RMO-14) vizsgálata során nyert adatokkal, megjegyezzük, hogy a jelenség magyarázata részben az eltérő immunszérum eltérő érzékenységében rejlik, illetve, annak lehetősége sem zárható ki, hogy egyes immunoreaktív axonszakaszokban a pathológiás folyamat visszafordul, a károsodás reverzibilis lesz, ezért 24 óra után az ilyen axonszakasz már nem látható mint immunreaktív szegmens. Az is elképzelhető

természetesen, hogy az immunreactiv axonszakasz a proteolysis felgyorsulása révén egyszerűen megemésztődik, s nem marad kimutatható epitop 24 órával a trauma után. Mindazonáltal a CsA- és a vehiculum-kezelt állatokban megfigyelt markáns rostdenzitásbeli különbség egyértelműen mutatja a gyógyszer jótékony hatását.

A CsA-ra vonatkozó terápiás ablak patkányban való leírásának illetve a posttraumás kezelés hatékonysága igazolásának további jelentőséget adhat, hogy számos közlés szerint a magasabb-rendű állatokban, így feltehetően emberben is, a traumakiváltotta axonális károsodás folyamata lassúbb, mint rágesálókban [102;133;134]. Eredményeink lehetőséget teremtettek a CsA – evonatkozású - terápiás hatásának klinikai kipróbálására, mely kísérletek a Virginia Commonwealth University Idegsebészeti Intézetében - jelen fázisban a terápiás biztonsági kísérletekkel - megkezdődtek illetve a kísérletek kivitelezésére egy ROI típusú NIH grant íródott.

Noha a fent-leírt neuroprotektív hatás széles körben elfogadottan a mitochondriális permeabilitási tranzíció folyamatának CsA - cyclophilin D mediálta - befolyásolásához köthető, változatlanul szükségesnek érezzük további analógoknak, elsősorban a Me-Val-Cyclosporinnak a fenti kísérletes modellben történő kipróbálását. Minthogy ez az analóg kizárólag az MPT jelenségét gátolja, a calcineurin enzim hatását viszont nem befolyásolja, megválaszolható lenne, hogy a kísérleteinkben észlelt neuroprotektív hatás mennyiben tudható be a "nitric oxide synthetase", s ezáltal a szabadgyök képződés gátlásának, illetve az immunszuppresszív hatásnak, melyekért a calcineurin gátlása felelős (Sabatini et al. 1997).

Ugyancsak további kísérletek feladata annak megállapítása, hogy a CsA-ra vonatkozó terápiás ablak a koponyatraumát követően időben meddig terjed pontosan, mert erre vonatkozóan jelenleg csak hozzávetőleges következtetések állnak rendelkezésünkre.

4.4. A kontrollált hypothermia hatásmechanizmusának vizsgálata DAI-ban

4.3.1. A kísérlet leírása

Annak ellenére, hogy számos elmélet született a hypothermia neuroprotektív voltának magyarázatára, pontos hatásmechanizmusát az axonális károsodás kivédésében mindeztáig nem sikerült meghatározni.

Mivel ismert, hogy kísérletes ischemiában a hőmérséklettel arányban nő a spectrin lebontási termékek mennyisége [111], továbbá magasabb hőmérsékleten a spectrin nagyobb valószínűséggel bomlik [186], felvetettük, hogy a hypothermia jótékony hatását - legalábbis részben - az általunk kulcsfontosságú folyamatnak ítélt - kalcium-indukálta, calpain-mediálta spectrin-lebomlás visszaszorítása útján fejtí ki. Nyilvánvalóan adódik a további kérdés: az enzimátikus folyamat lassítása következtében kialakult átmeneti hatással állunk-e szemben, avagy olyan jótékony hatással, mely a felmelegítést követően is fennmarad.

E kérdés megválaszolását célzó kísérleteink első fázisában a traumát közvetlenül követő, kontrollált hypothermiának a CSMP-IR-mértékére gyakorolt hatását vizsgáltuk 90 perccel a trauma után.

Vizsgálataink következő fázisa annak megállapítására irányult, hogy 90 perces hypothermiát követően a Koizumi és Povlishock (1998) által ismertített modellnek megfelelően 90 perc lassú, fokozatos felmelegítés után, összesen tehát három órával a

trauma után hogyan változik a CMSP-IR. Ugyancsak a három órás túlélést követően a NFC markerének (RMO-14) eloszlását is vizsgáltuk, feltételezve, hogy a CMSP estleges tartós gátlása ugyancsak maga után vonja a cytoszkeletális károsodás kialakulásának megelőzését illetve csökkenését is.

Ebben a szakszban (3 órás túlélés) a neuroprotektív hatás elmaradása egyértelműen azt jelezte volna, hogy a hypothermia hatása átmeneti, s a felmelegítés során a pathológias folyamatok ismét teljes sebességgel és intenzitással működnek.

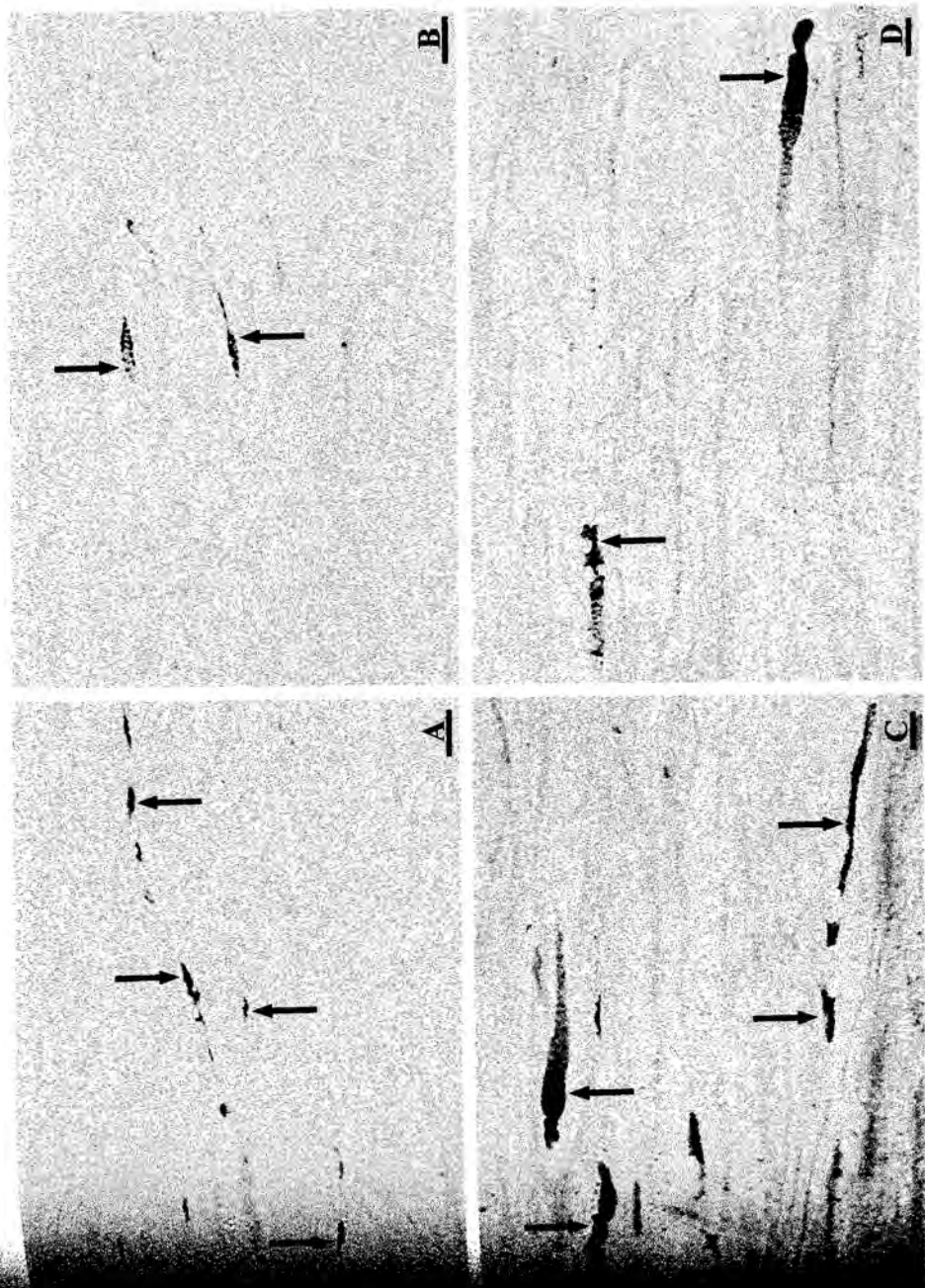
Mind a másfél, mind pedig a három órás túlélésű csoportban 5-5 control és hypothermia-kezelt állatot (összesen 20) operáltunk s hasonlítottunk össze qualitativ és quantitativ immunhisztokémiai módszerekkel.

Mint azt fentebb szintén említettük, a hypothermia therapiás alkalmazását vizsgáló kísérletsorozatban szereplő állatok mindegyikénél a teljes physiologiai monitorizálási rendszert alkalmaztuk.

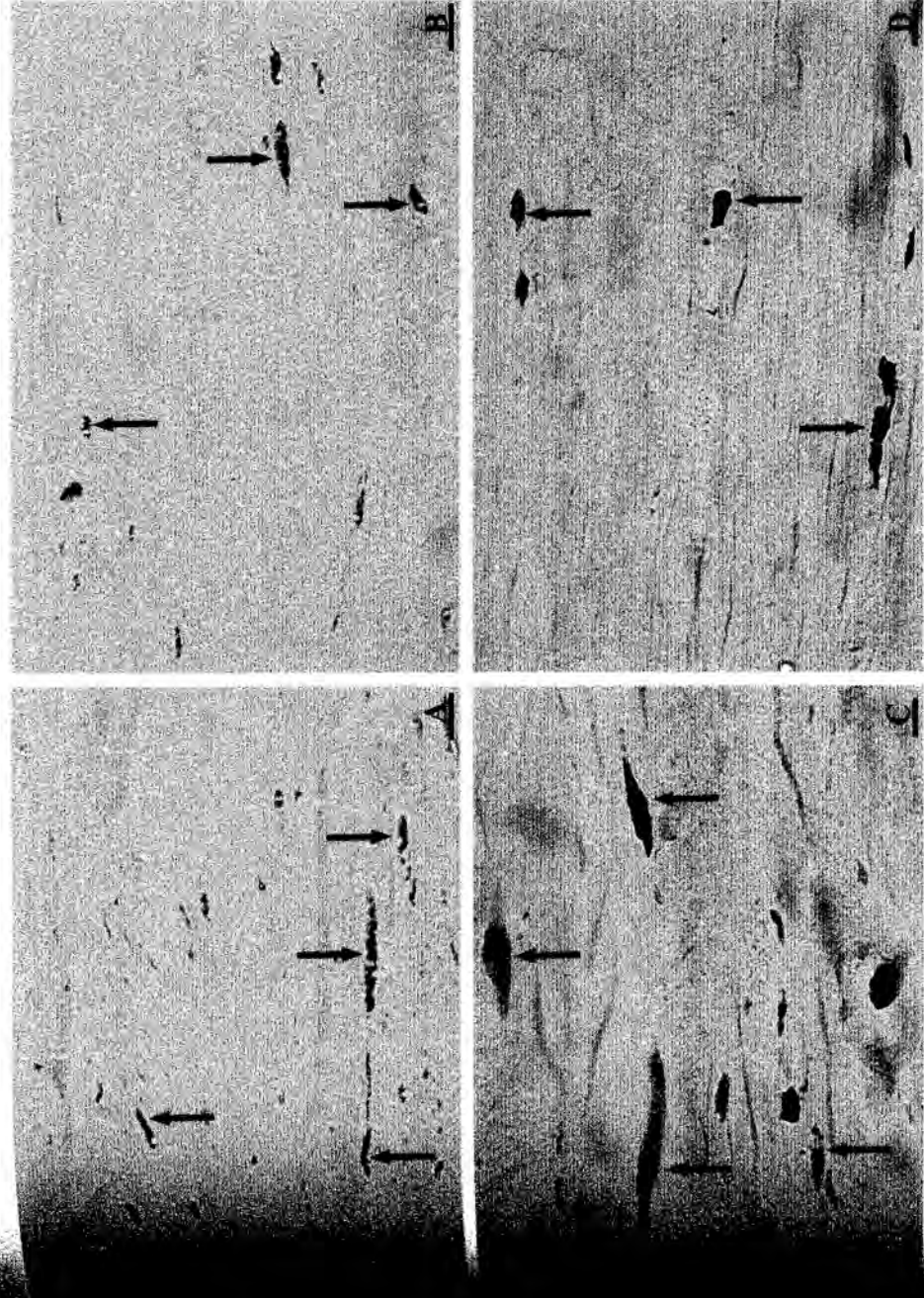
4.3.2. Eredmények

Leíró fénymikroszkópos vizsgálataink ismét megerősítették, hogy az Ab38 antitest, azaz a CMSP-IR kimutatása és az RMO-14 ellenanyag, azaz a NFC-IR megjelenítése érzékeny, megbízható eszköz a DAI vizsgálatára [25].

A traumát másfél órával túlélő csoportban az Ab38-IR axonszakaszok elsősorban fokális duzzadást és vacuolizációt mutattak (**13. ábra**), míg a három-óra túlélésűek esetében mind a CMSP, mind pedig a NFC markerével jelölt axonok jelentősebb százaléka kifejezett axonális retractsio ballon-képződésen ment keresztül, utalva ezzel a DAI előrehaladott voltára (**14. ábra**).



13. ábra. Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív axonok a TCSp területén másfél órával zárt koponyasérülés után, normothermiás kontroll állatban (A) illetve a traumát követően hypothermizált patkányban (B). Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív axonok a FLM területén másfél órával zárt koponyasérülés után, normothermiás kontroll állatban (C) illetve a traumát követően hypothermizált patkányban (D). A felvételek hűen demonstrálják a hypothermia közvetítette axonális védelmet DAI-ban. (Jel: 40 μm).



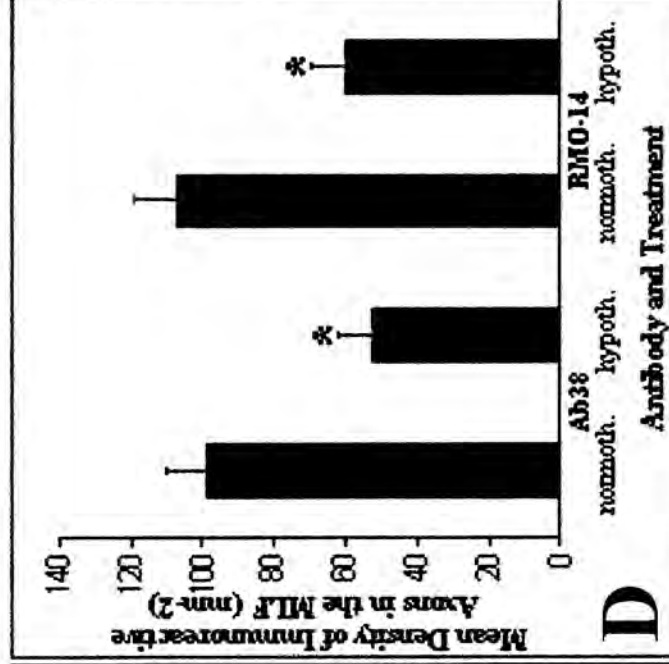
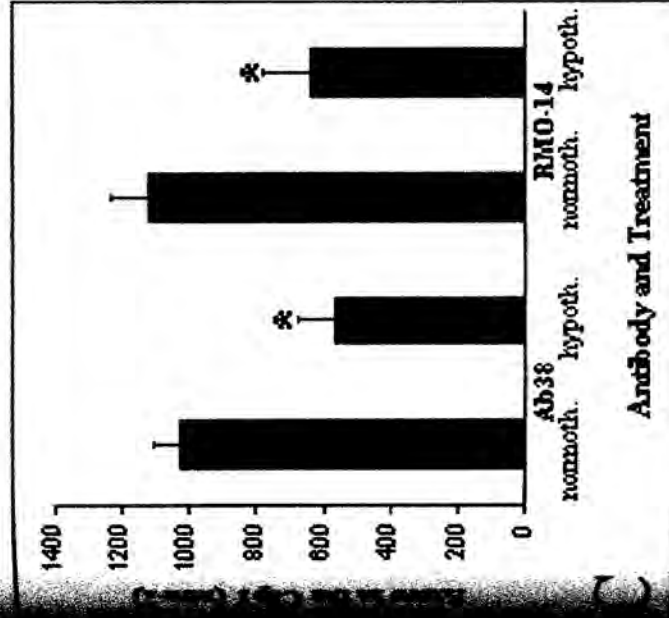
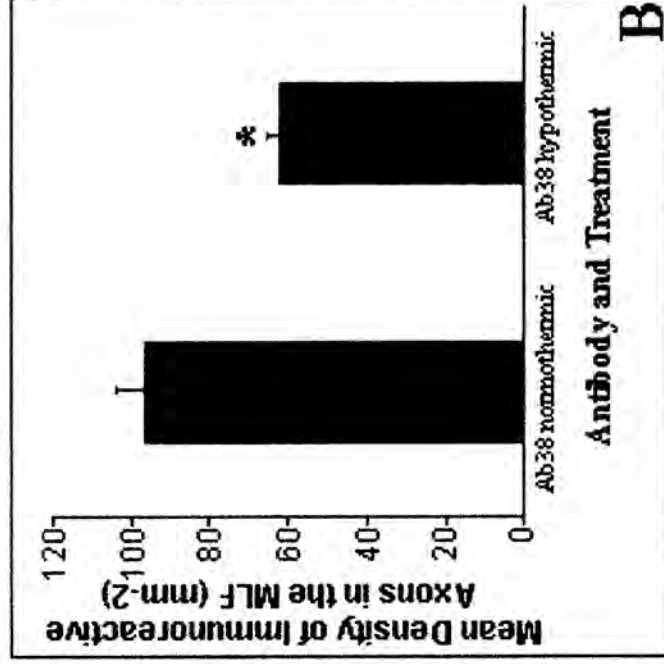
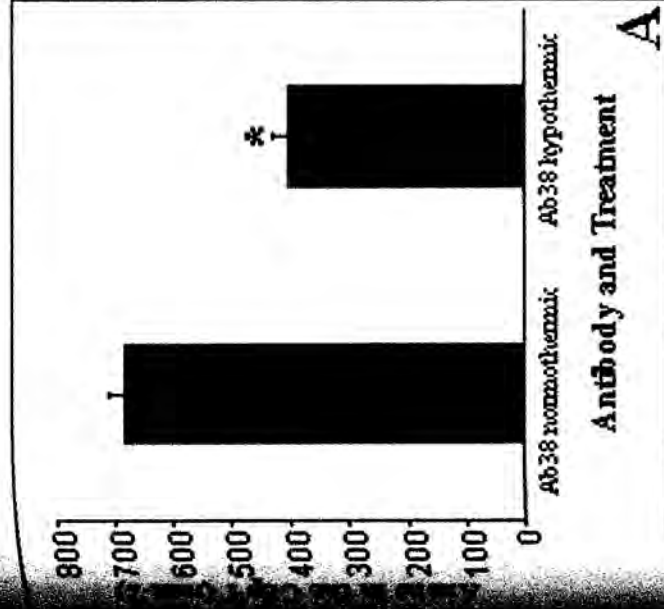
14. ábra. Neurofilament kompaktálódást mutató, RMO-14-immunreaktív axonok a TCSp területén három órával zárt koponyasérülés után normothermiás kontroll állapotban (A) illetve a traumát követően hypothermizált, majd 90 perc alatt fokozatosan visszamelegített patkányban (B). Neurofilament kompaktálódást mutató, RMO-14-immunreaktív axonok a FLM területén másfél órával zárt koponyasérülés után, normothermiás kontroll állapotban (C) illetve a traumát követően hypothermizált, majd 90 perc alatt fokozatosan visszamelegített patkányban (D). A felvételeken látható, hogy a 13. ábrához képest az immunreaktív-axondenzitász emelkedett, ugyanakkor az is egyértelmű, hogy a hypthermia közvetítette axonális védelmet a felmelegítés érdekében nem befolyásolja. (Jel: 40 μm).

Említést érdemel, hogy morfológiai tekintetben a normo- és hypothermia kezelt állatokban észlelt károsodott axonok között nem volt számottevő különbség. Ugyanakkor már a kvalitatív vizsgálat is sejtette, hogy a hypothermiás csoportokban várhatóan alacsonyabb immunhisztokémiaiilag jelölt axon-denzitást találunk majd.

A vak-módszerekkel végzett számítógépes képelemzés és kvantitatív adatfeldolgozás igazolta, hogy a korai posttraumás hypothermia szignifikáns védelmet nyújt az IA-sérülés által kiváltott DAI ellen.

Az Ab38-IR axonok denzitása a TCSp területén 90 perccel a trauma után a normothermiás körülmények között észlelt, statisztikailag szignifikáns mértékben, mm^2 -enkénti $674.9 \pm 26.3_{\text{Ab38IR}}$ (mean \pm sem) értékről $400.2 \pm 27.2_{\text{Ab38IR}}$ -ra csökkent a hypothermia kezelt állatokban ($p < 0.001$ ($t=7.26$, $df=8$)); ezzel párhuzamosan a FLM területén ugyancsak szignifikáns axonális védelem volt kimutatható a hypothermia kezelését kapott állatokban, az átlagos immunreaktív rostdenzitás $96.0 \pm 7.7_{\text{Ab38IR}}$ -ről $61.9 \pm 2.1_{\text{Ab38IR}}$ -re csökkent ($t=4.25$, $df=8$, $p < 0.01$) (15. A. és B. ábra).

Azokban az állatokban, amelyekben az Ab38 és RMO-14 immunreaktív rostok denzitását a felmelegítési szak végén vizsgáltuk, ugyancsak szignifikáns neuroprotektív hatást fejtett ki a kontrollált hypothermia: a normothermiás körülmények között IA-sérülésnek kitett, majd három-órás túlélés után feldolgozott állatokban az immunreaktív rostok denzitása a TCSp-ban négyzetmilliméterenként $M1027.2 \pm 77.8_{\text{Ab38IR}}$ illetve $1122.0 \pm 108.0_{\text{RMO14IR}}$ -értéknek adódott, ugyanez a hypothermiás, majd visszamelegített csoportban $568.1 \pm 112.6_{\text{Ab38IR}}$ és $638.5 \pm 143.0_{\text{RMO14IR}}$ -értékre csökkent ($t=3.35$, $df=8$, $p=0.01$ illetve $t=2.69$, $df=8$, $p < 0.03$, azaz mindkét érték szignifikánsan csökkent).



15. ábra. Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív, sérült axonok átlagos denzitásának (axonszám/mm²) összehasonlítása a TCSp (A) és a FLM (B) területén másfél órával zárt koponyasérülés után, normothermiás és hypothermiás patkányban. Calpain-mediálta spectrin-proteolysis-immunreaktív, illetve neurofilament kompaktálódást mutató, RMO-14-immunreaktív, sérült axonok átlagos denzitásának (axonszám/mm²) összehasonlítása a TCSp (C) és a FLM (D) területén három órával zárt koponyasérülés után, normothermiás és hypothermizált, majd fokozatosan visszamelegített patkányban. Az oszlopdiagrammok tetején elhelyezett *vonalka* a „standard errort („sem”)”, a *csillag* a szignifikáns különbséget jelzi. A hypothermia szignifikáns protektív hatása mindkét túlélési idő illetve protokoll esetén szembeötlő.

A fasciculus longitudinalis medialis területén újfent szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mind az Ab38 mind pedig az RMO-14 immunreaktív axonszakaszok denzitásában. A normothermiás állatoknál észlelt $98.5 \pm 11.1_{Ab38IR}$ és $107.2 \pm 12.3_{RMO14IR}$ – as rostdenzitási értékhez képest a hypothermiás állatokban a felmelegítési szak végén mért immunreaktív axondenzitás négyzetmilliméterenként $52.7 \pm 8.6_{Ab38IR}$ és $59.9 \pm 10.4_{RMO14IR}$ –os értékre csökkent. Mindkét immunreactio esetében szignifikáns a csökkenés mértéke, $t=3.26$, $df=8$, $p=0.01$ illetve $t=2.94$, $df=8$, $p<0.02$ (**15. C. és D. ábra**).

4.3.3. Következtetések

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a kontrollált, mérsékelt fokú hypothermia az impact-accelerációs koponyatrauma modellben szignifikánsan csökkenti azon károsodott axonoknak a denzitását, melyekben calpain-mediálta spectrin-proteolízis indukálódik. Ugyancsak megállapítottuk, hogy a CMSP szignifikáns visszaszorítása akkor is megfigyelhető, ha a therapiás (hypothermizált-) időszak végén az állatot fokozatosan felmelegítjük. Egyértelművé vált továbbá, hogy az axonális cytoskeletonban bekövetkező elváltozások, azaz a neurofilamentek immunhiszokémiai markerrel (RMO-14) detektálható oldalkar-módosulása és következményes összeecsapzódása a CMSP kivédésével párhuzamos csökkenést mutat.

Az eredmények elvi jelentősége abban áll, hogy a hypothermia hatásának új aspektusát tárják fel. Bár számos elmélet próbálja azonosítani a hypothermia jótékony hatásának okait különféle neurotrauma modellekben, s bár jelenleg randomizált, prospektív klinikai tanulmány folyik e kérdés vizsgálatára az Egyesült Államokban,

számos kérdés még megválaszolatlan, különös tekintettel a trauma kiváltotta DAI befolyásolása tekintetében.

Vizsgálataink kétséget kizáróan igazolták, hogy a CMSP alakulását a hypothermiával befolyásolni lehet. Tekintettel a - korábbi kísérleteinkben kimutatott - kalcium-indukálta, calpain-mediálta strukturális proteolízisnek a DAI pathogenezisében való jelentős szerepére, talán nem túlzás annak állítása, hogy a hypothermia jótékony hatását az axonális károsodás kivédésére – legalábbis jelentős részben - a kalcium indukálta, calpain mediálta spectrin-proteolízis gátlása útján fejti ki.

Joggal adódik a kérdés, hogy ez a hatás pusztán az enzimatikus folyamat *késleltetésének* útján valósul-e meg, avagy a neuro-(axono-) protektív hatás tartós védelmet jelent, amely a hypothermiából való felmelegítés után is fennáll. Kísérletünk e kérdésre is biztató választ adott, hiszen azt találtuk, hogy a hypothermiát követő másfél órás felmelegítési szakasz végén, amikor az állat már fokozatosan visszanyerte fiziológiás testhőmérsékletét, a CMSP-IR és a cytoszkeletális változások immunhisztokémiai markere még mindig szignifikáns neuro-(axono-) protektív hatást jelzett.

Az axonális diszkonnekció markerének (APP) vizsgálatával igazolható volt, hogy a hypothermiás állatokban az axonkárosodás mértéke 24-órás illetve egy-hetes túlélés után is szignifikánsan csökkent, sőt a funkcionális felépülés is meggyorsult [80;81].

Arra, hogy a fenti, acut szakaszban észlelt enzimatikus változás hogyan eredményezhet tartós axonális védelemet, az alábbi elméletet alkottuk meg: Feltételezve a CMSP-ről a korábbi kísérletek kapcsán leirtakat, elméletünk szerint a hypothermia idejekorán történő alkalmazása a trauma után jelentősen lelassítja a calpain activálódását,

kísélteti a korai szakaszban egyébként megfigyelt subaxolemmális spektrinolízist és ezáltal meggátolja, hogy a mechanoporáció okozta kezdeti kalcium beáramlás - a calpain aktiválódása útján - kiterjedt membránpermeabilitási változást és további kalcium akkumulációt okozzon. A kalcium beáramlás ilyen limitálása a (calpain által okozott direkt, illetve a kalcium által okozott indirekt) mitochondriális károsodást is kivédi, és ezzel elősegíti az axon lokális energia- és ion-homeosztázisának fenntartását, azaz, a kezdeti mechanoporáció és a – bár kisebb mértékben, de működő - subaxolemmális CMSP útján beáramlott kalciumtól való “megszabadulást”.

Elméletünk szerint tehát az enzim aktiválódásának kezdeti fékezése elősegíti, hogy a felmelegítési szakban illetve azt követően már olyan körülmények közé kerüljön az axon, amelyekben a mitochondriumok képesek megbirkózni a relative csekély membránpermeabilitás-változás okozta ionösszetétel-“kísiklással”. Mindez jó összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az axonális morphológia nem tér el jelentősen a hypothermiás és a normothermiás állapotokban, azaz, azokban az axonokban, ahol a fenti elmélettel leírt protektív mechanizmus nem működik megfelelően, vagy azért, mert a mechanoporáció okozta axonális kalcium akkumuláció túlzott CMSP-t indukálta, vagy azért, mert ugyanezen folyamat kifejezett, korai mitochondriális károsodásra vezetett, ott az immunoreaktiv axon kettészakadásához vezető pathológiai folyamat ugyanazon funkcionális és morphológiai grádicsokat járja, mint a normothermiás állapotban kialakuló, “szokásos” axonkárosodás.

A vizsgálat eredményének jelentősége tehát véleményünk szerint az, hogy – legalábbis az axonok szintjén - közelebb vitt a hypothermia kedvező hatásának megértéséhez, továbbá annak a megértéséhez, hogy az enzimatiszus folyamat

kinetikájának befolyásolása hogyan használható az axonális struktúra és funkció tartós védelmére.

5. Eredmények összefoglalása (tézisek)

5.1. A DAI pathomechanizmusáról alkotott jelenlegi képünk

A disszertációt lezáró szakaszban eredményeink jelentőségét abban a logikai sorrendben próbálom elemezni, ahogy a bevezetőben a kutatás célkitűzéseit meghatároztam.

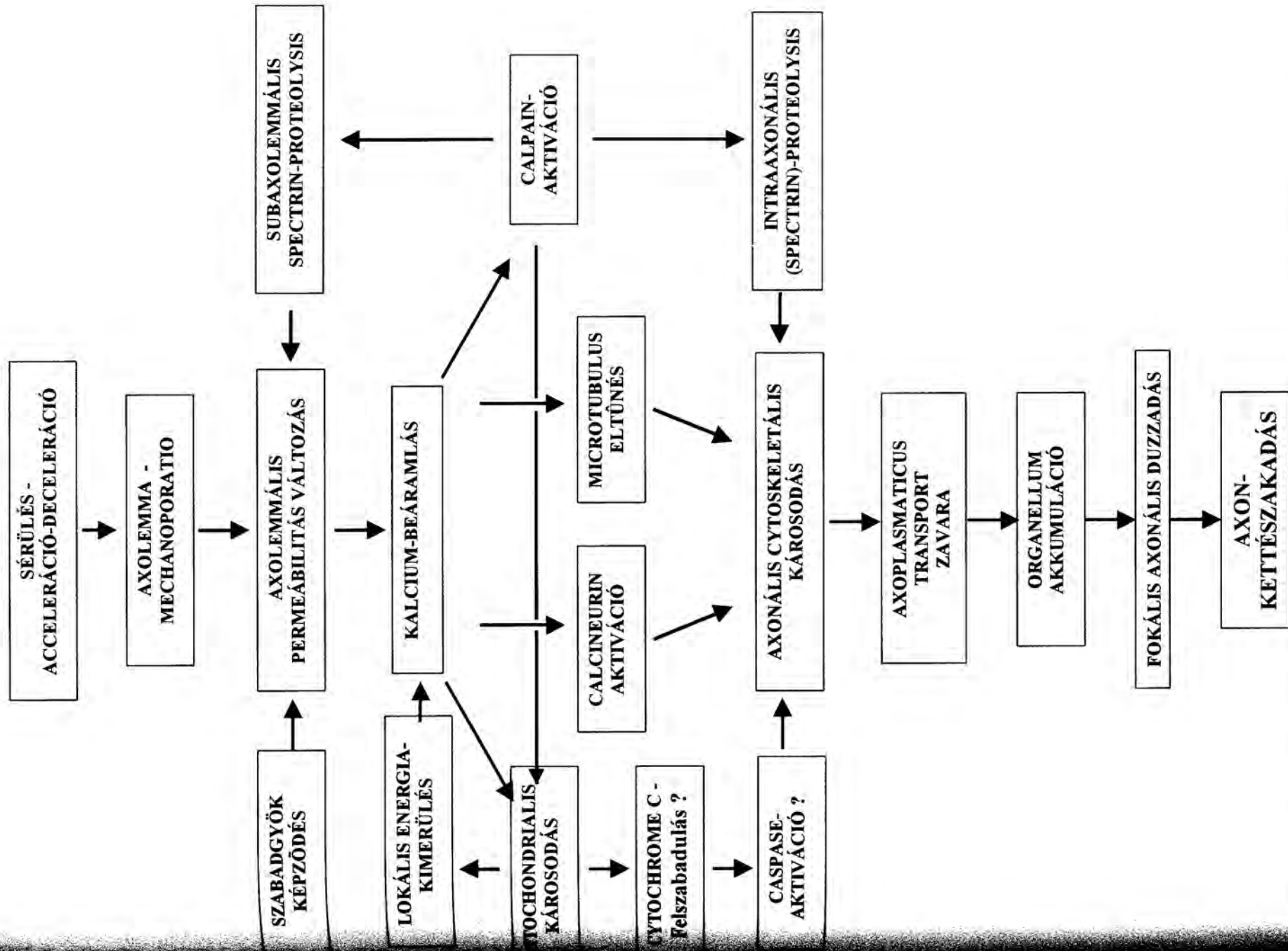
1., A kalcium-beáramlás által indukálta intraaxonális proteolízis szerepe a koponya trauma által kiváltott axonális károsodás kórereditében.

Immunbiológiai módszerek alkalmazásával sikerült egyértelmű igazolást találnunk arra, hogy a koponyasérülés során fokalís/diffúz károsodást szenvedett axonokban a kalcium indukálta proteáz, a calpain aktiválódik (**16. ábra**).

Az eddigi elméletekkel szemben azt találtuk, hogy az azonnali, az axon teljes átmérőjére kiterjedő aktiválódás helyett a kalcium indukálta, calpain-mediálta strukturális fehérbontás időben kompartmentalizációt mutat, azaz a korai posttraumás szakban döntően a subaxolemmális térre, az ott elhelyezkedő membrán-szkeletont avagy kortikális citoszkeletont alkotó spectrin-háló területére korlátozott, s csak a későbbiekben terjed ki az axoplazma teljes keresztmetszetére.

Összhangban a spectrin intraaxonális elhelyezkedésével illetve az axolemmális peremabilitás-változásoknak a DAI-ban ismert szerepével állítjuk, hogy a calpain és a calpain-mediálta spectrin lebontás döntő szerepet játszik a DAI pathogenezisében:

- az integráns membránfehérjékkel kacsolt spectrinháló emésztése az axolemmális átteresztőképesség fokozódásához vezet, ezáltal divalens kationok beáramlását segíti elő



16. ábra. A zárt koponyasérülés által kiváltott diffúz axonális károsodás pathomechanizmusáról alkotott elméletünk összefoglalása.

- a mitochondriális membrán permeabilitási pórusának indirect, kalcium akkumuláció által indukált illetve direct (proteolytikus hatásra történő) kinyílását elősegítve a calpain aktiválódása az axon energiaháztartásának összeomlását okozza
- a calpain - az intraaxonális cytoszkeleton proteolysis útján - az axon kettészakadásához vezető axoplazmatikus transzportzavart és következményes axonduzzadást indukál.

2., A koponyasérülés által károsított axonok energia- és ion-háztartásának fenntartását a mitochondriumok épségének és működőképességének megőrzése révén elősegítő szer (cyclosporin A) hatása a trauma által kiváltott diffuse axonális károsodásban.

A döntően a mitochondriális permeabilitási pórus kinyílásának gátlása révén a mitochondriumok divalens kation-töltés indukálta károsodását kivédő cyclosporin A szignifikánsan csökkenti az impact akcelerációs modellben keletkező károsodott axonok denzitását.

A mitochondrium működőképességének megőrzése - vélhetően az ionpumpák funkcionális állapotának fenntartása révén - a kalcium-indukálta, calpain-mediálta strukturális proteolízis szignifikáns csökkenéséhez vezet.

A calpain-mediálta spectrin proteolysis gátlása egyúttal az axonális cytoszkeleton integritásának megőrzésében is megnyilvánul, azaz a neurofilamentumok compactálódása, az axoplazmatikus transzport emiatti zavara és a kettészakadásra vezető

következményes axonduzzadás is szignifikánsan visszaesik a cyclosporin A-val való kezelés hatására.

Az axonok integritásának szignifikáns megőrzése huszonegy órával a trauma után is "tettenerhető".

További, immár közvetlen klinikai relevanciával bíró eredménye vizsgálatainknak annak igazolása, hogy a cyclosporin A nemcsak a trauma előtt, hanem harminc perccel a koponyasérülés *után* adva is kifejti neuro-(axono-) protektív hatását.

3., A koponyasérülés során károsodott axonok integritásának megőrzése/helyreállítása szabályozott hypothermia hatására.

A kontrollált hypothermia szignifikánsan csökkenti a zárt koponyasérülés kiváltotta axonális károsodás mértékét.

Ez a neuro-(axono-) protektív hatás – legalábbis részben - a calpain-mediálta spectrin proteolízis gátlásán alapul, mely gátlás – a CMSP feltételezett pathogenetikai szerepével összhangban - az axonális cytoszkeleton károsodásának kivédésében is megnyilvánul.

A kísérleti állat hőmérsékletének élettani értékre való visszaállítása a hypothermia neuroprotektív hatását nem csökkenti; magyarázatunk szerint azért, mert a korai posttraumás szakban a mechanoporáció okozta kalcium-beáramlás által indukált, CMSP-mediálta másodlagos axolemmalis károsodást az enzimatis folyamat lassítása illetve az energiafelhasználás optimalizálása révén a hypothermia kivédi, így a kalcium akkumuláció az axonok jelentős részében nem lesz olyan mértékű, amely az axon kettészakadásához vezető pathológias folyamatok teljes kifejlődését kiváltaná.

5.2. Amire (jelenleg) nincs magyarázat...

Az axonális károsodásról alkotott képet számos további megfigyelés árnyalja és bonyolítja: jelen tudásunk szerint axonátmérőtől és localizációtól függően meglehetősen eltérő pathophysiologiai folyamatokat figyelhetünk meg a károsodott neuritekben. Így például az amyloid precursor protein immunoreaktivitás vizsgálatával sikerült megállapítani, hogy a patkány pyramis pályájában létezik egy kis átmérőjű axonpopuláció, mely esetében az immunreaktivitás specifikusan a nodalis-paranodalis szakaszra terjed és az axon integritása a traumát követően jóval hosszabb ideig megtartott, mint a fent leírt pathológiát mutató vastagabb axonokban, melyekben az immunreaktivitás elsősorban az internodalis szakaszon található [167].

A jelenlegi elméletek közül csak kevés tulajdonít megfelelő jeletőséget annak a ténynek, hogy az immunhisztokémiailag detektálható, károsodott axonpopulációhoz képest jóval nagyobb azon axonok száma, amelyek a traumát követően speciális módszerekkel ezüstözhetővé válnak ("sötét axon jelenség"), s ultrastrukturálisan a cytoskeleton kompaktálódását mutatják [47-50]. A citoszeletalis kompaktálódást s az azzal járó speciális ezüstöződési képességet vélhetően szintén az axont a trauma által egy adott ponton ért nyíró erők indítják el, amennyiben azok olyan energia csomagot közvetítenek, melynek vectora alkalmas az axonális citoskeletonban tárolt mechanikai energia felszabadítására, s ezáltal az axonális citoskeleton alacsonyabb energia-szintre hozására [49]. Jövőbeni vizsgálataim egyik célja annak a tisztázása, hogy ez a folyamat milyen viszonyban áll a klasszikus illetve a jelen disszartációban alkalmazott immunhisztokémiai markerekkel detectált axonális károsodás jelenségével.

Mint azt részletesen taglaltuk, a károsodott axonszakaszban a beáramló kalcium a mitochondriumok károsodását is előidézi (vide supra) és ezáltal az axonszegmens energetikai állapota, ionegyensúlya összeomlik. A mitochondrium direkt károsodása, a mitochondriális permeabilitási tranzíciós pórus kinyílása proapoptoticus mediátorok felszabadulását idézve elő *elméletileg* további fehérjebontó enzimek aktiválását is maga után vonhatja, így a caspase enzimesalád 3-mas számmal jelölt, az apoptózis folyamatában kulcsszerepet betöltő tagja is aktiválódhat

[28;35;40;45;46;62;67;82;100;112;113;117;159;172-175;183;188]. Ez az enzim - szemben a calpainnal - a béta spektrint bontja, s ezáltal irreverzibilisen hasítja a fodrin molekulát, ami ekkor teljes mértékben elveszíti a membránhoz való kötődés képességét [184;186]. Továbbá, előzetes vizsgálatok eredményei szerint, a caspase-3 esetleges aktiválódása a calpain fiziológias gátló enzimjét, a calpastatint is hasítja, tovább gerjesztvén ezzel a calpain aktivitását [115;130;166;185]. Ezen folyamatoknak az axonban történő aktiválódása minden bizonnyal irreverzibilis axonkárosodáshoz vezet. Hogy a caspase enzimesalád aktiválódása valóban bekövetkezik-e az axonális mitochondrium károsodásakor, arra *jelenleg* még nincs bizonyítékunk.

5.3. A DAI kutatásának irányai eredményeink tükrében

Az elmúlt másfél évtized közelebb vitt a DAI pathomechanizmusának megértéséhez, ugyanakkor az eredmények számos új kérdést vetettek fel.

Elengedhetetlennek tűnik eredményeink tükrében annak vizsgálata, hogy a calpain szelektív inhibitorai, melyek a proteosomát nem gátolják, képesek-e az axolemmális permeabilitási változás kivédésére. Válaszra vár az a kérdés is, hogy a

károsodott axolemma "befoltozására" képesek-e az axonok ("resealing") és, hogy ez a képességük hogy befolyásolható.

A cyclosporin A kezeléssel elért eredmények ugyancsak szembesítendők olyan analogokkal, amelyek *kizárólag* mitochondriális támadáspontúak, mint a Met-Val-CsA, kizárva ezzel a calcineurin-gátlás szerepét a CsA kedvező hatásainak okai közül. Ilyen analóg alkalmazása minden tekintetben hasznos volna, hiszen az immunszuppresszáns hatás *nélküli* neuroprotektív hatású szer volna optimális klinikai tesztelésre.

A hypothermia esetében döntő volna annak megítélése, hogy a felmelegítés gyorsasága hogyan befolyásolja a kezelés eredményességét; ezt a kérdést különösen hasznos lett volna még az Egyesült Államokbeli prospektív klinikai tanulmány indítása előtt részletesen tisztázni.

Amennyiben a jelenleg folyó (hypothermia) illetve jelenleg induló (CsA) klinikai tanulmányok eredménye biztató lesz, úgy feltétlenül érdemes annak vizsgálata, hogy a gyógyszeres kezelés előnyösen kombinálható-e a hypothermiával. Erre irányuló előzetes eredményeink rendkívül biztatóak [119].

Az elmúlt évtizedekben indított preklinikai-klinikai tesztek teljes sikertelensége, az a tény, hogy ezen időszak intenzív laboratoriumi és klinikai kutatótevékenysége ellenére a neurotrauma humán therapiás eszköztára gyakorlatilag évtizedek óta változatlan, önmagában indokolja új, az eddigtől gyökeresen eltérő, mégis racionális therapiás lehetőségek vizsgálatát. Ez a disszertáció egy ilyen irányvonalat próbált felvázolni.

Irodalomjegyzék

- (1) Adams H, Mitchell DE, Graham DI, Doyle D. Diffuse brain damage of immediate impact type. Its relationship to 'primary brain-stem damage' in head injury. *Brain* 1977; 100(3):489-502.
- (2) Adams JH. Diffuse axonal injury in non-missile head injury. *Injury* 1982; 13(5):444-445.
- (3) Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 1989; 15(1):49-59.
- (4) Adams JH, Doyle D, Graham DI, Lawrence AE, McLellan DR. Microscopic diffuse axonal injury in cases of head injury. *Med Sci Law* 1985; 25(4):265-269.
- (5) Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA, Maxwell WL. Diffuse axonal injury in non-missile head injury [editorial]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54(6):481-483.
- (6) Adams JH, Graham DI, Murray LS, Scott G. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases. *Ann Neurol* 1982; 12(6):557-563.
- (7) Adams JH, Graham DI, Scott G, Parker LS, Doyle D. Brain damage in fatal non-missile head injury. *J Clin Pathol* 1980; 33(12):1132-1145.
- (8) Aguilar HI, Botla R, Arora AS, Bronk SF, Gores GJ. Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: a mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology* 1996; 110(2):558-566.

- (9) Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnar O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem J* 1996; 318 (Pt 3):897-901.
- (10) Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest* 1978; 39(3):254-266.
- (11) Banik NL, Chakrabarti AK, Hogan EL. Effects of detergents on Ca(2+)-activated neural proteinase activity (calpain) in neural and non-neural tissue: a comparative study. *Neurochem Res* 1992; 17(8):797-802.
- (12) Banik NL, Matzelle DC, Gantt-Wilford G, Osborne A, Hogan EL. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res* 1997; 752(1-2):301-306.
- (13) Bartus RT. The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common cytotoxic pathway. *Neuroscientist* 1997; 3:314-327.
- (14) Bartus RT, Chen EY, Lynch G, Kordower JH. Cortical ablation induces a spreading calcium-dependent, secondary pathogenesis which can be reduced by inhibiting calpain. *Exp Neurol* 1999; 155(2):315-326.
- (15) Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero DL, Lynch G. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15(6):969-979.
- (16) Bartus RT, Dean RL, Mennerick S, Eveleth D, Lynch G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. *Brain Res* 1998; 790(1-2):1-13.
- (17) Bartus RT, Hayward NJ, Elliott PJ, Sawyer SD, Baker KL, Dean RL, Akiyama A, Straub JA, Harbeson SL, Li Z. Calpain inhibitor AK295 protects neurons from focal brain ischemia. Effects of postocclusion intra-arterial administration. *Stroke* 1994; 25(11):2265-2270.

- (18) Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 1996; 396(2-3):189-195.
- (19) Blumbergs PC, Jones NR, North JB. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52(7):838-841.
- (20) Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 1994; 344(8929):1055-1056.
- (21) Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. *J Neurotrauma* 1995; 12(4):565-572.
- (22) Bramlett HM, Dietrich WD, Green EJ, Busto R. Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 93(2):190-199.
- (23) Bramlett HM, Green EJ, Dietrich WD, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD. Posttraumatic brain hypothermia provides protection from sensorimotor and cognitive behavioral deficits. *J Neurotrauma* 1995; 12(3):289-298.
- (24) Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7(6):729-738.
- (25) Büki A, Koizumi H, Povlishock JT. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp Neurol*. 1999; 159:319-328.
- (26) Büki A, Okonkwo DO, Povlishock JT. Postinjury Cyclosporin A Administration Limits Axonal Damage and Disconnection in Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 1999; 16(6):511-521.

- (27) Büki A, Siman R, Trojanowski JQ, Povlishock JT. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(4):365-375.
- (28) Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):139-149.
- (29) Carson KA, Mesulam MM. Electron microscopic demonstration of neural connections using horseradish peroxidase: a comparison of the tetramethylbenzidine procedure with seven other histochemical methods. *J Histochem Cytochem* 1982; 30(5):425-435.
- (30) Chakrabarti AK, Banik NL, Lobo DC, Terry EC, Hogan EL, Banik NL. Calcium-activated neutral proteinase (calpain) in rat brain during development: compartmentation and role in myelination. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 71(1):107-113.
- (31) Chakrabarti AK, Dasgupta S, Gadsden RH, Sr., Hogan EL, Banik NL. Regulation of brain m calpain Ca²⁺ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca²⁺ level. *J Neurosci Res* 1996; 44(4):374-380.
- (32) Christman CW, Grady MS, Walker SA, Holloway KL, Povlishock JT. Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *J Neurotrauma* 1994; 11(2):173-186.
- (33) Davidson AM, Halestrap AP. Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar [Ca²⁺], but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. *Biochem J* 1990; 268(1):147-152.
- (34) Denny-Brown D, Russel WR. Experimental cerebral concussion. *Brain* 1941; 64:93-164.
- (35) Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of

- bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis [In Process Citation]. *J Cell Biol* 1999; 144(5):891-901.
- (36) Diakowski W, Sikorski AF. Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids. *Biochemistry* 1995; 34(40):13252-13258.
- (37) Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Loo Y. Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1990; 21(9):1318-1325.
- (38) Erb DE, Povlishock JT. Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 76(4):347-358.
- (39) Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, Buku A, Ghiso J, Mehta P, Robakis NK. Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively [In Process Citation]. *J Neurochem* 1999; 72(4):1417-1422.
- (40) Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bel-xL. *J Biol Chem* 1999; 274(4):2225-2233.
- (41) Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 1994; 80(2):301-313.
- (42) Folbergrova J, He QP, Li PA, Smith ML, Siesjo BK. The effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrene on bioenergetic state in substantia nigra following fluoroethyl-induced status epilepticus in rats. *Neurosci Lett* 1999; 266(2):121-124.
- (43) Frappier T, Derancourt J, Pradel LA. Actin and neurofilament binding domain of brain spectrin beta subunit. *Eur J Biochem* 1992; 205:85-91.
- (44) Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 1998; 18(14):5151-5159.

- (45) Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Copin JC, Calagui B, Epstein CJ, Chan PH. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 1999; 19(9):3414-3422.
- (46) Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(11):1239-1247.
- (47) Gallyas F, Hsu M, Buzsaki G. Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: 'dark' neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Methods* 1993; 50(2):159-164.
- (48) Gallyas F, Zoltay G, Balas I. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to contusing concussive head injury in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 83(4):394-401.
- (49) Gallyas F, Zoltay G, Dames W. Formation of "dark" (argyrophilic) neurons of various origin proceeds with a common mechanism of biophysical nature (a novel hypothesis). *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 83(5):504-509.
- (50) Gallyas F, Zoltay G, Horvath Z. Light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to post-mortem concussive head injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 83(5):499-503.
- (51) Geddes JW, Bondada V, Tekirian TL, Pang Z, Siman RG. Perikaryal accumulation and proteolysis of neurofilament proteins in the post-mortem rat brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16(4):651-660.
- (52) Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathology of the Head Injuries. *Semin Clin Neuropsychiatry* 1998; 3(3):160-175.

- (53) Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 1982; 12(6):564-574.
- (54) Gennarelli TA, Thibault LE, Tipperman R, Tomej G, Sergot R, Brown M, Maxwell WL, Graham DI, Adams JH, Irvine A. Axonal injury in the optic nerve: a model simulating diffuse axonal injury in the brain. *J Neurosurg* 1989; 71(2):244-253.
- (55) Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993; 160(2):139-144.
- (56) George EB, Glass JD, Griffin JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* 1995; 15(10):6445-6452.
- (57) Gleckman AM, Bell MD, Evans RJ, Smith TW. Diffuse axonal injury in infants with nonaccidental craniocerebral trauma: enhanced detection by beta-amyloid precursor protein immunohistochemical staining [In Process Citation]. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123(2):146-151.
- (58) Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem* 1995; 65(4):1704-1711.
- (59) Gogarten W, Van Aken H, Moskopp D, Roos N, Schleef J, Marcus M, Meyer J. A case of severe cerebral trauma in a patient under chronic treatment with cyclosporine A. *J Neurosurg Anesthesiol* 1998; 10(2):101-105.
- (60) Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, Zagon IS, Barker JE, Bloom ML. Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res Bull* 1995; 36(6):593-606.
- (61) Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF. Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during

cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):167-175.

- (62) Gorman AM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Ceccatelli S. Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* 1999; 11(3):1067-1072.
- (63) Greenberg MS. Handbook of Neurosurgery. Greenberg MS, editor. 4th[Two], 690-753. 10-26-1996. Lakeland, FL, Greenberg Graphics, Inc. Head Trauma. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (64) Greenwood JA, Troncoso JC, Costello AC, Johnson GV. Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem* 1993; 61(1):191-199.
- (65) Griffiths EJ, Halestrap AP. Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. *Biochem J* 1991; 274(Pt 2):611-614.
- (66) Grofova I, Zhou M. Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 1998; 395(3):359-379.
- (67) Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999; 274(2):1156-1163.
- (68) Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem* 1999; 72(3):1019-1029.

- (69) Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 1990; 268(1):153-160.
- (70) Harris AS, Croall DE, Morrow JS. Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium- dependent protease I. *J Biol Chem* 1989; 264(29):17401-17408.
- (71) Hayashi M, Inomata M, Saito Y, Ito H, Kawashima S. Activation of intracellular calcium-activated neutral proteinase in erythrocytes and its inhibition by exogenously added inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094(3):249-256.
- (72) Henker RA, Brown SD, Marion DW. Comparison of brain temperature with bladder and rectal temperatures in adults with severe head injury. *Neurosurgery* 1998; 42(5):1071-1075.
- (73) Hong SC, Lanzino G, Goto Y, Kang SK, Schottler F, Kassell NF, Lee KS. Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res* 1994; 661(1-2):43-50.
- (74) Hu RJ, Bennett V. In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J Biol Chem* 1991; 266:18200-18205.
- (75) Kaibara T, Sutherland GR, Colbourne F, Tyson RL. Hypothermia: depression of tricarboxylic acid cycle flux and evidence for pentose phosphate shunt upregulation. *J Neurosurg* 1999; 90(2):339-347.
- (76) Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Schmutzhard E, Clifton GL, Hayes RL. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update. *J Neurotrauma* 1997; 14(3):121-134.

- (77) Kataoka K, Mitani A, Yanase H, Zhang L, Higashihara M, Ogata T, Tsuji K, Nakamura Y, McRae A, Ogita K, Yoneda Y. Ischemic neuronal damage. How does mild hypothermia modulate it? *Mol Chem Neuropathol* 1996; 28(1-3):191-195.
- (78) Knox-Dubois CY, Markgraf CG, Kennon K, Chaney SF, ifton GL. Efficacy of therapeutic hypothermia is affected by rewarming time.(Abstract from the Sixteenth Annual National Neurotrauma Symposium). *J Neurotrauma* 1999; 15(10):877.
- (79) Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X, Bullock R. Effects of mild hypothermia on cerebral blood flow-independent changes in cortical extracellular levels of amino acids following contusion trauma in the rat. *Brain Res* 1997; 747(2):304-312.
- (80) Koizumi H, Povlishock JT. Posttraumatic hypothermia in the treatment of axonal damage in an animal model of traumatic axonal injury. *J Neurosurg* 1998; 89(2):303-309.
- (81) Koizumi H, Povlishock JT. Early posttraumatic hypothermia provides persisting axonal protection and improves behavioral outcome. *Brain Res* 1999; (In Review).
- (82) Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10):5752-5757.
- (83) Kuroda S, Janelidze S, Siesjo BK. The immunosuppressants cyclosporin A and FK506 equally ameliorate brain damage due to 30-min middle cerebral artery occlusion in hyperglycemic rats. *Brain Res* 1999; 835(2):148-153.

- (84) Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. *FEBS Lett* 1993; 323(1-2):151-154.
- (85) Lakos S, Basbaum AI. Benzidine dihydrochloride as a chromogen for *in situ*. *J Histochem Cytochem* 1986; 34(8):1047-1056.
- (86) Lamb RG, Harper CC, McKinney JS, Rzigalinski BA, Ellis EF. Alterations in phosphatidylcholine metabolism of stretch-injured cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1997; 68(5):1904-1910.
- (87) Lee KS, Yanamoto H, Fergus A, Hong SC, Kang SD, Cappelletto B, Toyoda T, Kassell NF, Bavbek M, Kwan AL. Calcium-activated proteolysis as a therapeutic target in cerebrovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 825:95-103.
- (88) Lee VM, Carden MJ, Schlaepfer WW, Trojanowski JQ. 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* 1987; 7(11):3474-3488.
- (89) Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):177-196.
- (90) Levey AI, Bolam JP, Rye DB, Hallanger AE, Demuth RM, Mesulam MM, Wainer BH. A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. *J Histochem Cytochem* 1986; 34(11):1449-1457.
- (91) Lewin ICF. Update of Max, W., Mackenzie, E.J., Rice, D.P. Head injuries: costs and consequences. *J Head Trauma Rehabil* 1991; 67:76-91.

- (92) Li Z, Hogan EL, Banik NL. Role of calpain in spinal cord injury: increased calpain immunoreactivity in spinal cord after compression injury in the rat. *Neurochem Int* 1995; 27(4-5):425-432.
- (93) Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 1992; 31(16):3896-3901.
- (94) Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66(4):807-815.
- (95) Liu J, Sakane T, Tsunematsu T. The effects of FK-506 and cyclosporin A on the proliferation of PHA-stimulated T cells in response to IL-2, IL-4 or IL-6. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98(4):293-298.
- (96) Lyeth BG, Jiang JY, Liu S. Behavioral protection by moderate hypothermia initiated after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1993; 10(1):57-64.
- (97) Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, Wisniewski SR, DeKosky ST. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med* 1997; 336(8):540-546.
- (98) Marion DW, White MJ. Treatment of experimental brain injury with moderate hypothermia and 21-aminosteroids. *J Neurotrauma* 1996; 13(3):139-147.
- (99) Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80(2):291-300.
- (100) Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andr, Fakan S, Martinou JC. The Release of Cytochrome c from Mitochondria during Apoptosis of NGF-deprived Sympathetic Neurons Is a Reversible Event. *J Cell Biol* 1999; 144(5):883-889.

- (101) Maxwell WL, Irvine A, Graham, Adams JH, Gennarelli TA, Tipperman R, Sturatis M. Focal axonal injury: the early axonal response to stretch. *J Neurocytol* 1991; 20(3):157-164.
- (102) Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review [published erratum appears in *J Neurotrauma* 1997 Oct;14(10):755]. *J Neurotrauma* 1997; 14(7):419-440.
- (103) Maxwell WL, Watt C, Graham DI, Gennarelli TA. Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non-human primates. *Acta Neuropathol (Berl)* 1993; 86(2):136-144.
- (104) McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: 1998 [In Process Citation]. *J Neurotrauma* 1998; 15(10):731-769.
- (105) McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee VM, Trojanowski JQ. The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24(4):251-267.
- (106) McKenzie KJ, McLellan DR, Gentleman SM, Maxwell WL, Gennarelli TA, Graham DI. Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? *Acta Neuropathol (Berl)* 1996; 92(6):608-613.
- (107) Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1990; 28(1):26-33.
- (108) Mitani A, Kadoya F, Kataoka K. Temperature dependence of hypoxia-induced calcium accumulation in gerbil hippocampal slices. *Brain Res* 1991; 562(1):159-163.

- (109) Mitani A, Kataoka K. Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience* 1991; 42(3):661-670.
- (110) Montal M. Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):113-126.
- (111) Morimoto T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Zhao W. Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; 746(1-2):43-51.
- (112) Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, Chen SF, Chan PH. Release of mitochondrial cytochrome c and DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice: possible role in neuronal apoptosis. *Neurosci Lett* 1999; 267(3):201-205.
- (113) Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(14):8144-8149.
- (114) Newcomb JK, Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Pike BR, Liu SJ, Clifton GL, Hayes RL. Immunohistochemical study of calpain-mediated breakdown products to alpha-spectrin following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 1997; 14(6):369-383.
- (115) Newcomb JK, Pike BR, Zhao X, Banik NL, Hayes RL. Altered calpastatin protein levels following traumatic brain injury in rat [In Process Citation]. *J Neurotrauma* 1999; 16(1):1-11.
- (116) Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, Selman WR. Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D- aspartate in cortical

- neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. *Neuroscience* 1996; 75(4):993-997.
- (117) Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17(25):3237-3245.
- (118) Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG, Saternus KS. Axonal injury--a diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. *Forensic Sci Int* 1998; 95(1):67-83.
- (119) Okonkwo DO, Büki A, Koizumi H, Stone JP, Povlishock JT. Cyclosporin A potentiates hypothermia neuroprotection in traumatic brain injury in rat. *J.Neurotrauma* 1999; 16[10], 982-982.
- (120) Okonkwo DO, Büki A, Siman R, Povlishock JT. Cyclosporin A Limits Calcium-Induced Axonal Damage Following Traumatic Brain Injury. *Neuroreport* 1999; 10(2):353-358.
- (121) Okonkwo DO, Pettus EH, Moroi J, Povlishock JT. Alteration of the neurofilament sidearm and its relation to neurofilament compaction occurring with traumatic axonal injury. *Brain Res* 1998; 784(1-2):1-6.
- (122) Okonkwo DO, Povlishock JT. An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(4):443-451.
- (123) Pant HC. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 1988; 256(2):665-668.
- (124) Peerless SJ, Rewcastle NB. Shear injuries of the brain. *Can Med Assoc J* 1967; 96(10):577-582.
- (125) Pettus EH, Christman CW, Giebel ML, Povlishock JT. Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. *J Neurotrauma* 1994; 11(5):507-522.

- (126) Pettus EH, Povlishock JT. Characterization of a distinct set of intra-axonal ultrastructural changes associated with traumatically induced alteration in axolemmal permeability. *Brain Res* 1996; 722(1-2):1-11.
- (127) Pierce JE, Smith DH, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience* 1998; 87(2):359-369.
- (128) Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Hayes RL. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 1998; 9(11):2437-2442.
- (129) Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Wang KK, Posmantur RM, Hayes RL. Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 1998; 52(5):505-520.
- (130) Porn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ* 1998; 5(12):1028-1033.
- (131) Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 1997; 77(3):875-888.
- (132) Povlishock JT. Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986; 70(1):53-59.
- (133) Povlishock JT. Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. *Brain Pathol* 1992; 2(1):1-12.
- (134) Povlishock JT. Pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and man. *Ann Emerg Med* 1993; 22(6):980-986.

- (135) Povlishock JT. Pathophysiology of neural injury - therapeutic opportunities and challenges. *Clin Neurosurg*. In press.
- (136) Povlishock JT, Becker DP, Cheng CL, Vaughan GW. Axonal change in minor head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983; 42(3):225-242.
- (137) Povlishock JT, Büki A, Okonkwo DO, Stone JP, Koizumi H. Initiating mechanisms involved in the pathobiology of traumatically induced axonal injury and interventions targeted at blunting their progression. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; 73:15-20.
- (138) Povlishock JT, Christman CW. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 1995; 12(4):555-564.
- (139) Povlishock JT, Jenkins LW. Are the pathobiological changes evoked by traumatic brain injury immediate and irreversible? *Brain Pathol* 1995; 5(4):415-426.
- (140) Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, Trojanowski JQ, Moroi J. Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(4):347-359.
- (141) Povlishock JT, Pettus EH. Traumatically induced axonal damage: evidence for enduring changes in axolemmal permeability with associated cytoskeletal change. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1996; 66:81-86.
- (142) Roberts-Lewis JM, Savage MJ, Marcy VR, Pinsker LR, Siman R. Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J Neurosci* 1994; 14(6):3934-3944.
- (143) Rzigalinski BA, Liang S, McKinney JS, Willoughby KA, Ellis EF. Effect of Ca²⁺ on in vitro astrocyte injury. *J Neurochem* 1997; 68(1):289-296.
- (144) Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA, Ellis EF. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem* 1998; 70(6):2377-2385.

- (145) Saatman KE, Bozyczko-Coyne D, Marcy V, Siman R, McIntosh TK. Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(7):850-860.
- (146) Saatman KE, Graham DJ, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma* 1998; 15(12):1047-1058.
- (147) Saatman KE, Murai H, Bartus RT, Smith DH, Hayward NJ, Perri BR, McIntosh TK. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(8):3428-3433.
- (148) Sabatini DM, Lai MM, Snyder SH. Neural roles of immunophilins and their ligands. *Mol Neurobiol* 1997; 15(2):223-239.
- (149) Sakamoto KI, Fujisawa H, Koizumi H, Tsuchida E, Ito H, Sadamitsu D, Maekawa T. Effects of mild hypothermia on nitric oxide synthesis following contusion trauma in the rat. *J Neurotrauma* 1997; 14(5):349-353.
- (150) Schlaepfer WW, Zimmerman UJ. Calcium-activated proteolysis of intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 455:552-562.
- (151) Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; 13(4):136-142.
- (152) Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke* 1998; 29(12):2461-2466.
- (153) Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 88(5):433-439.
- (154) Sherriff FE, Bridges LR, Jackson P. Microwave antigen retrieval of beta-amyloid precursor protein immunoreactivity. *Neuroreport* 1994; 5(9):1085-1088.

- (155) Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 87(1):55-62.
- (156) Shields DC, Banik NL. Pathophysiological role of calpain in experimental demyelination [In Process Citation]. *J Neurosci Res* 1999; 55(5):533-541.
- (157) Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, Sugimoto T. Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury [see comments]. *J Neurosurg* 1993; 79(3):363-368.
- (158) Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9(2):127-140.
- (159) Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB, Uchino H. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; 73:7-13.
- (160) Siesjo BK, Hu B, Kristian T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? [comment]. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(1):19-26.
- (161) Siesjo BK, Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13(3):247-268.
- (162) Siman R, Baudry M, Lynch G. Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(11):3572-3576.
- (163) Siman R, Noszek JC. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1988; 1(4):279-287.

- (164) Siman R, Noszek JC, Kegerise C. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci* 1989; 9(5):1579-1590.
- (165) Smith SL, Hall ED. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 1996; 13(1):1-9.
- (166) Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 178(3):311-319.
- (167) Stone JR, Walker SA, Povlishock JT. The visualization of a new class of traumatically injured axons through the use of a modified method of microwave antigen retrieval [In Process Citation]. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97(4):335-345.
- (168) Strich SJ. Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1956; 19:163-185.
- (169) Strich SJ. Shearing of nerve fibers as a cause of brain damage due to head injury: A pathological study of twenty cases. *Lancet* 1961; 2:443-448.
- (170) Strich SJ. Lesions in the cerebral hemispheres after blunt head injury. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1970; 4:166-171.
- (171) Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Na(+)-Ca2+ exchanger mediates Ca2+ influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann Neurol* 1991; 30(3):375-380.
- (172) Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274(8):5053-5060.

- (173) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189(2):381-394.
- (174) 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. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [see comments]. *Nature* 1999; 397(6718):441-446.
- (175) Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):151-165.
- (176) Symonds CP. Concussion and contusion of the brain and their sequelae. In: Brock S, editor. *Injuries of the Skull, Brain and Spinal Cord*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1943: 65-103.
- (177) Tomlinson BE. Brain-stem lesions after head injury. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1970; 4:154-165.
- (178) Tompa P, Baki A, Schad E, Friedrich P. The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J Biol Chem* 1996; 271(52):33161-33164.
- (179) Toupalik P. [Diagnosis of early phase diffuse axonal injury using immunohistochemical methods]. *Soud Lek* 1998; 43(4):50-54.
- (180) Trost LC, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278(3):1000-1005.
- (181) Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 1996; 38(6):1176-1195.

- (182) Uchino H, Elmer E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjo BK. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 1998; 812(1-2):216-226.
- (183) Uehara T, Kikuchi Y, Nomura Y. Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH- SY5Y cells. *J Neurochem* 1999; 72(1):196-205.
- (184) Wang KK. Calpain and Caspase: Can you tell the difference? *TINS*. In press.
- (185) Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356(2):187-196.
- (186) Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 1998; 273(35):22490-22497.
- (187) Waxman SG. The Axon. Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK, editors. 1st[1], 218-244. 1995. New York, NY, Oxford University Press.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (188) Wolf CM, Eastman A. The temporal relationship between protein phosphatase, mitochondrial cytochrome c release, and caspase activation in apoptosis [In Process Citation]. *Exp Cell Res* 1999; 247(2):505-513.
- (189) Yoshimoto T, Siesjo BK. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia [In Process Citation]. *Brain Res* 1999; 839(2):283-291.
- (190) Zagon IS, Higbee R, Riederer BM, Goodman SR. Spectrin subtypes in mammalian brain: an immunoelectron microscopic study. *J Neurosci* 1986; 6(10):2977-2986.

- (191) Zhang L, Song L, Parker EM. Calpain inhibitor I increases beta-amyloid peptide production by inhibiting the degradation of the substrate of gamma-secretase. Evidence that substrate availability limits beta-amyloid peptide production [In Process Citation]. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8966-8972.
- (192) Zhou M, Grofova I. The use of peroxidase substrate Vector VIP in electron microscopic single and double antigen localization. *J Neurosci Methods* 1995; 62(1-2):149-158.
- (193) Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241(2):139-176.

Köszönetnyilvánítás

Hogy a Virginia Commonwealth University Anatómiai Intézetében a fenti kísérleteket elvégezhessem és a Martin Rodbell Ösztöndíj adta páratlan lehetőséget kihasználni képes legyek, a Pécsi Orvostudományi Egyetem Anatómiai Intézetében Flerkó Béla és Liposits Zsolt Professzor Úrak környezetében eltöltött évek adtak alapot.

Lengvári István és mindenképp Merenthaler István Tanár Úrak soha nem szűnő támogatása, kritikája és barátsága minden – nem csak metodikai - nehézségen átsegített.

A támogató és nyugodt háttér, amit Dóczy Tamás Professzor biztosított s, Professor Úr személyes bátorítása nélkül a kutatási ösztöndíjat elnyerni s e munkát elvégezni nem lettem volna képes.

Gallyas Professzor Urat külön köszönet illeti az egyetemi évek alatt nyújtott támogatásért és "oktásért", illetve áldozatos, ugyanakkor kritikus mentori munkájáért, mellyel e disszertáció megszületése felett bábáskodott.

A John T. Povlishock-Professzor Úr által vezetett intézet, a VCU Department of Anatomy volt az az eszményi közeg, ahol a pécsi alapokra támaszkodva elkészülhetett a disszertáció alapjául szolgáló munka döntő hányada, Povlishock Professzor pedig a kivételes mentor, főnök és atyai barát, akinek támogatása további bátorítást ad a kutatás folytatására, immár itthon.

A disszertációban összefoglalt munka elvégzésében, a természetesen adódó kudarcok és önmagam elviselésében feleségem, Juditot és kislányom, Sárát illeti a legfőbb hála.

Végül, köszönöm a Barátaimnak s mindenkinél jobban Szüleimnek a biztatást, támogatásukat és türelmüket, amivel megajándékoztak