

A KOPONYATRAUMA ÁLTAL KIVÁLTOTT DIFFÚZ AXONÁLIS ÉS NEURONÁLIS KÁROSODÁS PATHOMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA ÉS TERÁPIÁS BEFOLYÁSOLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Farkas Orsolya

Témavezető: Dr. Gallyas Ferenc

Dr. Büki András



Elméleti Orvostudományok, Doktori Iskola vezetője: Dr. Szolcsányi János

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

Klinikai Orvostudományok, Doktori Iskola vezetője: Dr. Nagy Judit

Klinikai Idegtudományok, Programvezető: Dr. Komoly Sámuel

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2007

I. BEVEZETÉS

A balesetek során bekövetkező agysérülés gyakorisága a motorizációval párhuzamosan emelkedik; a fejlett ipari országokban a 40 év alatti lakosság körében a vezető halálokat képezi. A WHO felmérései szerint 10 millió baleseti agysérülésből következő haláleset, vagy kórházi ápolás történik világszerte minden évben, és a világon kb. 57 millió ember szenvedett élete során legalább egyszer traumás agysérülést. Hazánkban a koponya-agysérültek évi száma közel 14 000, ebből 71,3% enyhe, 19,4% közepes, és 9,4% a súlyos kategóriába tartozik. A súlyos koponya-agysérültek 55%-a hal meg az akut ellátás során. A túlélők közül az elbocsátáskor 40% tartós vegetatív állapotú, vagy súlyos maradványtüneteket mutat, csak 45%-a gyógyul enyhe maradványtünetekkel vagy maradványtünetek nélkül.

A koponyatrauma által kiváltott agysérülések igen heterogén betegségecsoportot képviselnek. A disszertáció tárgyát képező vizsgálataink *egyik* része - a traumás agysérüléseken belül - a diffúz axonális- és idegsejt-károsodások állatkísérletes aspektusaira szorítkoznak. Vizsgálataink *másik* része pedig – állatkísérletes adatokra támaszkodva – a humán baleseti agysérülések közvetlen tanulmányozását tűzte ki céljául.

A diffúz axonális károsodás (diffuse axonal injury, DAI) a koponyatrauma hatására kialakult primer axonális elváltozások összessége, melyek az agy egész állományára kiterjedve, ép axonok között elszórtan figyelhetők meg, egyébként többnyire ép parenchimális környezetben. E kórkép klinikai jelentőségét azok az adatok hangsúlyozzák, melyek szerint ez felelős 50 %-ban a tartós tudatzavarért, illetve 35 %-ban a mortalitásért a nem-térfoglaló jellegű koponya-sérülésekben. A diffúz axonális károsodásnak és állatkísérletes megfelelőjének, a traumás axonkárosodásnak (TAI) két, morfológiailag jól elkülöníthető megjelenési formája ismert: az axonduzzadás/axonballon-képződés (AD/B) és az ultrastrukturális (neurofilament) kompakció (UC). Az AD/B a trauma hatására kialakuló, előre-irányuló axontranszport károsodása következtében alakul ki, kimutatása a transzportzavar következtében felhalmozódó anyagok elleni antitestek alkalmazásával lehetséges. A legelterjedtebb ezek közül a béta amyloid precursor protein (APP), amely a DAI diagnózisának legszélesebb körben alkalmazott eszközévé vált. Az UC jelensége csak a 90-es években került leírásra. Kezdetben úgy gondolták, hogy a citoskeletális elváltozások ugyanazokat az axonokat érintik, mint az AD/B. Mára azonban már világossá vált, hogy az AD/B, illetve az UC két különböző axonpopulációt érint az esetek túlnyomó többségében, és csak kis részben figyelhető meg egyazon károsodott axonon belül. Az UC kimutatására a kompaktálódott közepes méretű neurofilament alegység (NF-M) elleni RMO-14 antitestet alkalmazzák, amely a megnövekedett intraaxonális Ca^{2+} indukálta és calpain által mediált strukturális fehérjebontás következményeként szabaddá vált NF-M „rod domain”-hez képes kötődni. E technikával azonban csak minimum 15 perccel a koponyatrauma kiváltása után tudtak axon-kompakciót kimutatni. Ugyanakkor egy speciális ezüstözési eljárással a trauma után azonnal leölt állatokban, sőt post mortem is kimutatható egy – hosszú axonszakaszok megvékonyodásával járó – argyrophil károsodás, amely fénymikroszkópos megjelenése lehet az UC-nek. E jelenség más megvilágításba helyezi az UC kialakulásának mechanizmusában feltételezett enzimatis reakciók kizárólagos szerepét.

Az utóbbi évtizedekben viszonylag sok kutatási projekt irányult a koponyasérülések során kialakuló diffúz axonkárosodás vizsgálatára. Ugyanakkor kevés figyelem fordult annak vizsgálatára, hogy ugyanazok az erők, melyek axonkárosodást váltanak ki, okoznak-e neuronális sérüléseket is diffúz eloszlásban, egyébként ép parenchimális környezetben. A legutóbbi vizsgálatok szerint a trauma által kiváltott direkt plazmamembrán-sérülés („mechanoporáció”) – az axonok mellett – idegsejteket is érint az agykéregben, a

hippocampusban és a thalamusban, diffúz eloszlásban. A megfigyelt neuronális elváltozások spektruma e neuronok körében a gyors nekrozistól az ultrastrukturálisan ki nem mutatható elváltozásokig terjedt. Ez utóbbi jelenség háttérében – azaz abban, hogy a sejtmembrán-sérülés nem feltétlenül vezet az érintett idegsejt pusztulásához – a szerzők az idegsejt-membrán gyors helyreállítódását (resealing) feltételezték. Ez-irányú kísérletek azonban mindezidáig nem történtek.

II. VIZSGÁLATOK

1. Az ultrastrukturális axon-kompakció kapcsolata az argyrophil axonkárosodással.

Háttér: Különböző módon előidézett koponyatrauma után (i) egy speciális, és reprodukálható eredményű ezüstöző eljárás hosszú axon-szakaszokat fest feketére, nem-festődő axonok közt sporadikus (diffúz) eloszlásban, (ii) valamint ultrastrukturális (neurofilament) kompakciót hoz létre számos elektron-mikroszkópos axon-profilban, nem-kompaktálódott axon-profilok közt sporadikus (diffúz) eloszlásban.

Céltűzés: Annak a – tapasztalati úton nyert feltételezésnek – igazolása, hogy az ezüstöződő axon-szakaszok azonosak az UC-t szenvedett axon-profilokkal.

Módszer: A Marmarou-féle készülékkel végzett koponya-trauma után, a szíven keresztüli perfúzióval azonnal fixált patkányok agyából készített 150 µm-es vibratomos sorozat-metszetek közül minden ötödiket megezüstöztük. (A) vizsgálat: Az ezüstözött axon-szakaszt tartalmazó területeket elektron-mikroszkópos megfigyelésre ozmifikáltuk, Durcupanba ágyasztuk, „ultra-metszettük” és kontrasztoltuk. (B) vizsgálat: Nem-ezüstözött vibratomos metszetek ugyanezen területeiből ozmifikálás és Durcupanba ágyazás után 1 µm-es metszeteket készítettünk, ezeket megezüstöztük, majd újra beágyasztuk, „ultrametszettük” és kontrasztoltuk.

Eredmények: (A) vizsgálat: Az ezüstözés erősen roncsolja az ultrastruktúrát; fellazítja a myelin-hüvelyek lemezeit, feloldja a normális axonokat, de - homogenizált formában - megőrzi a kompaktálódott axon-profilokat. Ezüst-szemcséket csak kompaktálódott axon-profilokban találtunk; másrészt nem találtunk olyan kompaktálódott axon-profilot, amely nem tartalmaztak ezüst-szemcséket. (B) vizsgálat: Minthogy az ezüstözést ozmifikálás és Durcupanba ágyazás előzte meg, az ultrastruktúra kiválóan megőrződött. Sok, és viszonylag nagy ezüst-szemcsét találtunk a kompakciót szenvedett axon-profilokban; másrészt nem találtunk olyan kompaktálódott axon-profilot, amely nem tartalmazott sok nagy ezüst-szemcsét.

Következtetések: (1) Az alkalmazott ezüstöző módszer lehetővé teszi az UC-t szenvedett axon-szakaszok fénymikroszkópos feltüntetését vastag vibratomos metszeteken; ezáltal vizsgálhatóvá teszi ezen károsodást elszenvedett axonok térbeli elhelyezkedését, valamint az elektron-mikroszkópos vizsgálatra érdemes területek kiválasztását. Továbbá, szemben a vonatkozó korábbi elképzelésekkel, (2) az UC a trauma pillanatában következik be, nem pedig 5-15 perces késéssel, (3) a citoskeletális kompakció viszonylag hosszú, akár 1 mm-es axon-szakaszokra is kiterjedhet, azaz nem EM-szintű „fokális” elváltozás.

2. Ultrastrukturális kompakció szelektív előidézésére alkalmas koponyatrauma modell kidolgozása

Háttér: A diffúz axonkárosodás koponyatraumát szenvedett kísérleti állatokban két jól elkülöníthető morfológiai elváltozás formájában jelentkezik: (i) az előre-irányuló intraaxonális transzport-zavar által előidézett axonduzzadás/ballon-képződés (AD/B), (ii) az ezüstöződéssel járó ultrastrukturális kompakció (UC). Míg az előbbi jól ismert humán

vonatkozásban is, az utóbbi szerepe a DAI-ban kevésbé tisztázott. A meglévő koponyatrauma-modellek az említett axonális elváltozások – és egyéb károsodások – együttes létrehozására, és ezáltal a TAI komplex vizsgálatára alkalmasak, az egyes morfológiai jellemzők szelektív vizsgálata azonban használatukkal nem lehetséges.

Célkitűzés: Olyan koponyatrauma-modell kidolgozása, melynek segítségével az UC kialakulása és a kompaktálódott axonok sorsa – más morfológiai elváltozások befolyásoló hatása nélkül – vizsgálható.

Módszer: Patkányok puha koponya-tetején kontrollálható-mélységű benyomódást hoztunk létre pillanat-szerűen, majd a patkányokat azonnal, illetve 1 vagy 4 órával később, formalinos vagy glutáraldehides fixálóval perfundáltuk. A koponyatrauma előtt, illetve a túlélés időtartamában monitoroztuk a légzés-számot, a pulzusszámot, a vérnyomást és a koponyaüri nyomást. Az 1 nap múlva kivett agyakból készített vibratamos metszetek közül minden harmadikat megezüstöztük; a formalinban fixáltaknál a „közbeeső” metszetek APP immun-hisztokémiára vagy RMO-14 immun-hisztokémiára kerültek, míg a glutáraldehides „közbeeső” metszeteknek az ezüstözés alapján vizsgálni érdemesnek tartott területeit elektron-mikroszkópiára ágyasztuk be.

Eredmények: 0.75 mm-es benyomódás esetén a vizsgált fiziológiai paraméterek a koponyatrauma után 1 perccel visszatértek a koponyatrauma előtti értékekre; ezüstözött illetve UC-t szenvedett axonok csak a benyomódás alatti agykéregben voltak megfigyelhetők, normális axonok között elszórtan, ép parenchimális környezetben. Egyéb morfológiai elváltozást nem találtunk. A károsodott axonok száma a koponyacsont-benyomódás mértékével párhuzamosan változott. Azonnal, illetve 1 órával a trauma után a kompaktálódott axonok homogéneen ezüstözödtek, míg 4 órával a traumát követően pontszerű ezüstöződés volt megfigyelhető. Intraaxonális transzportzavart mutató (anti-APP-pozitív) axonok csak 1 mm-es, vagy nagyobb benyomódás esetén voltak láthatók; RMO-14 pozitivitást egyetlen esetben sem észleltünk.

Következtetések: (1) A kidolgozott koponyatrauma-modell 0.75 mm-es koponyacsont-benyomódás esetén alkalmas az ultrastrukturális axon-kompakció szelektív előidézésére, ezáltal alkalmas a kompaktálódott axonok sorsának – más morfológiai elváltozások vagy patofiziológiai tényezők befolyásoló hatása nélküli – vizsgálatára. (2) Az APP-pozitivitás hiánya megerősíti azt az elképzelést, hogy az intraaxonális transzportzavar és az axon-kompakció két különböző axon-populációt érint. (3) A kompaktálódott axonok az agykéregben több óra elteltével sem festődnek az agytörzsi axon-kompakció kimutatására széles körben elterjedt markerrel, az RMO-14 antitesttel. A jelenség valószínűleg azzal magyarázható, hogy – ellentétben az agytörzs nagy-kaliberű, myelinizált axonjaival – az agykéreg vékony axonjaiban igen kevés az axon-kalibert meghatározó NF-M alegység, amelynek a calpain-aktiválódás hatására szabaddá vált „rod domainjét” mutatja ki az RMO-14 antitest.

3. A kompaktálódott axonok sorsának vizsgálata szelektív ultrastrukturális kompakciót kiváltó koponyatrauma modellben

Háttér: Az ultrastrukturális axon-kompakció a TAI konzekvens morfológiai velejárója, ennek ellenére eddig nem vizsgálták az érintett axonok sorsát. Ugyanakkor ismert, hogy UC-t szenvedett idegsejtek egy hányada néhány óra alatt spontán „meggyógyul” (recovery), másik hányada viszont elpusztul. Minthogy az axon-kompakció illetve az idegsejt-kompakció feltételezhetően azonos mechanizmussal megy végbe (lásd 4. pont), feltételezhető, hogy a kompaktálódott axonoknak is csak egy hányada pusztul el, a többi viszonylag gyorsan visszanyeri eredeti morfológiáját.

Célkitűzés: A 2. pontban ismertetett koponyatrauma módszer segítségével szelektíven kompakttá tett axonok sorsának nyomon követése.

Módszer: 0.75 mm-es koponyacsont-benyomódást létrehozó koponyatraumát szenvedett patkányokat a trauma kiváltása után azonnal illetve 6 hónapig terjedő túlélési idő elteltével glutáraldehid-tartalmú fixálóval perfundáltunk, az agykból készült metszetek egy hányadát ezüstöztük, a szomszédos metszetek EM feldolgozásra kerültek. Egy kiválasztott agykérgi területen a kompaktálódott, illetve a nem-kompaktálódott myelinizált axonok számát kvantitatív analízis céljából megállapítottuk.

Eredmények: Az agykéreg vizsgált területén a kompaktálódott myelinizált axonok száma az azonnal-perfundált patkányokban több, mint kétszer annyi volt, mint az 1 napot vagy az 1 hetet túléltekben. Az azonnal, illetve a 4-órás túlélés után leölt patkányokban számos UC-t mutató myelinizált axon-profil volt megfigyelhető. A túlélési idő növekedésével egy sor egyéb ultrastrukturális elváltozás került megfigyelésre; így (i) membrán-örvények megjelenése az első két túlélési napban egyébként ép ultrastrukturájú axon-profilokban, (ii) a kompaktálódott axon-profilok ultrastrukturájának homogenizációja az első két túlélési napban, (iii) később a homogenizált ultrastrukturális területek fragmentációja, (iv) majd a fragmentumok felcserélődése oligodendroglia-citoplazmával, és (v) végül axolemmával körülvett, neurofilamenteket tartalmazó profilok megjelenése szokatlanul sok oligodendroglia-citoplazmát tartalmazó myelinizált axonokban. (vi) Kiemelendő, hogy makrofág infiltrációra, mikroglia proliferációra és a Waller-féle degeneráció késői, előrehaladott stádiumára utaló jeleket nem láttunk még 6 hónap elteltével sem.

Következtetések: (1) A kompaktálódott axonok >50%-a 1 napon belül, míg <10%-a 1 nap és 1 hét között visszanyeri eredeti ultrastrukturáját; ennek jele a „membrán-örvények” megjelenése. (2) A többi kompaktálódott axon néhány hónap alatt regenerálódik (lásd az eredmények (ii)-(vi) pontjait). (3) Feltételezhető, hogy a fentiek szerepet játszanak a koponyatraumát szenvedett betegek fizikai és szellemi teljesítményeinek gyors (az első trauma-utáni nap folyamán végbemenő) illetve lassú (a néhány hónappal később végbemenő) javulásában. (4) A Waller-féle (irreverzibilis) degenerációval szembeni eltérés magyarázata abban keresendő, hogy a vizsgált esetben nem szakad meg a kapcsolat a kompaktálódott axon myelin-burka, és az azt tápláló oligodendroglia közt; ezért a myelin-burok nem pusztul el, és így pályát képez a regenerálódó axon számára. (5) Az alkalmazott modelltől ismert, hogy nem vált ki tartós rosszabbodást a fiziológiai jellemezőkben. Ennek tudható be a talált spontán-gyógyulási képesség, valamint a degeneráció reverzibilitása.

4. Az ultrastrukturális axon- illetve idegsejt-kompakció mechanizmusának tisztázása

Háttér: Különböző patobiokémiai tényezők (köztük hipoglikémia, ischemia és epilepsia), továbbá fizikai behatások (elektromos sokk, koponyatrauma) képesek azonos morfológiai elváltozások (ultrastrukturális kompakció) létrehozására. Fénymikroszkópos szinten ismert, hogy ugyanilyen morfológiai elváltozás jön létre post mortem is idegsejtekben a nem-fixált, vagy rosszul fixált agynak a koponyából való kivétele során elszenvedett mechanikai megterhelés hatására. Az azonos morfológia a kiváltó károsító hatástól független közös kialakulási mechanizmust feltételez; a post mortem kialakulás lehetősége pedig nem-enzim-közvetített folyamatra utal. A polimer gél-kémiából ismert egy, a kiváltó tényezőtől független mechanizmusú, és tárolt nem-kovalens kötésekkel származó energia hatására végbemenő, egy pontból kiindulóan tovaterjedő folyamat, a gélből gél fázisátalakulás, melynek szerepét az élő sejt egyes mechanizmusában már feltételezték.

Célkitűzés: (1) In vivo, illetve az enzim-közvetített folyamatok számára rendkívül kedvezőtlen körülmények között végzett, azonos típusú mechanikai behatás által kiváltott ultrastrukturális idegsejt- illetve axon-kompakció morfológiai jellemzőinek összehasonlítása annak bizonyítására, hogy a kompakció kialakulásának mechanizmusa nem enzim-közvetített folyamat. (2) Annak valószínűsítése, hogy ez a folyamat mind energetikai, mind strukturális

szempontból gélből-gél fázisátalakulás.

Módszerek: A Marmarou-féle készülékkel koponyatraumát hajtottunk végre egyrészt post mortem (glutáraldehydes fixálóval végzett 30-perces, szíven-keresztüli perfúziót követően 0-fok közelébe hűtött patkányokon), másrészt in vivo (közvetlenül a perfúziós fixálás előtt a Marmarou-féle készülékkel traumatizált patkányokon). Az 1 nappal később kivett agyakból készített vibratomos metszetek egy része ezüstözésre, másik része EM feldolgozásra került. Kvantitatív analízis céljából meghatároztuk a hosszanti ultrastrukturális elemek közti átlag-távolságot mind kompaktálódott, mind pedig normál axonokban.

Eredmények: (A) Az in vivo és a post mortem koponyatrauma egyforma morfológiai elváltozásokat eredményezett, mind a (i) a hyperbasophilia, (ii) a III-típusú argyrophilia, (iii) a hiper-elektronenzitás, mind pedig (iv) az UC jellegzetességeinek tekintetében. (B) Az ultrastrukturális axon-kompakció foka a post mortem trauma esetén nem különbözött az in vivo trauma esetén meghatározottól. (C) A trauma-indukálta ezüstöződés minkét esetben „minden vagy semmi” jellegű volt, azaz az érintett szóma-dendrit domainek teljes egészére, illetve hosszú axon-szakaszokra terjedt ki, de általában nem egyazon idegsejt szóma-dendrit domainét és axonját érintette.

Következtetések: Az ultrastrukturális idegsejt- és axon-kompakció mechanizmusában nem enzim-közvetített folyamatok játszanak szerepet, hiszen (1) valószínűtlen, hogy ugyanolyan morfológiai eredménnyel folynak le biokémiai folyamatok *in vivo* és *post mortem*, vagyis az enzimátikus folyamatoknak kedvező illetve rendkívül kedvezőtlen körülmények között. (2) A „minden-vagy-semmi” jelenség csak úgy magyarázható, hogy a kompakció egyetlen kezdeti pontból terjed ki az érintett idegsejt szóma-dendrit domainjének egészére, vagy egy hosszú axonszakaszra. Elképzelhetetlen ugyanis, hogy a kompakció az érintett idegsejt szóma-dendrit domainjének valamennyi pontján egyszerre iniciálódjon a pillanatszerű koponyatrauma hatására, a szomszédos idegsejtek szóma-dendrit domainjének pedig egyetlen pontját sem. Nagyon valószínűtlen az is, hogy egy enzim-közvetített reakció csillapodás nélkül végigterjedjen az érintett sejt szóma-dendrit domainjének egészén vagy hosszú axon-szakaszokon, különösen az enzimátikus reakcióknak rendkívül kedvezőtlen körülmények között. Az UC jelenségének magyarázatára feltételeztük, hogy az ismert ultrastrukturális elemek (organellumok, citoskeleton) közti terekben egy összefüggő, fehérje-mátrixú gél-struktúra található, amely energiát tárol nem-kovalens kötések formájában. Ebben a gél-struktúrában a gél mátrixát felépítő fehérje-molekulák kooperatív konformáció-változása következtében fázisátalakulás megy végbe, miközben a megkötött vízmolekulák illetve K^+ ionok egy jelentős hányada felszabadul a gél összehúzódását (térfogatcsökkenés) eredményezve. Az összehúzódó gél a hozzákötött ultrastrukturális elemeket magával vonja (kompakció). A polimer-kémiából ismert, hogy a gélből-gél fázisátalakulás iniciálható mind fizikai, mind kémiai behatásokkal, és reverzibilis lehet, összhangban a „sötét” idegsejtek és axonok hasonló képességeivel.

5. Egy sejt-permeábilis calpain-inhibitor, az MDL-28170, hatásának vizsgálata a diffúz axonkárosodásra

Háttér: A koponyatrauma által kiváltott axolemma-permeabilitási zavar („mechanoporáció”) – a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció révén – calpain aktiválódáshoz, az axonális citoskeleton részleges lebontásához és következményes NFC-hez vezet. Kontúziós koponyatrauma-modellekben a calpain gátlása jótékony hatásának bizonyult az agykérgi citoskeletonális károsodások, és funkcionális károsodások csökkentésében, illetve a használni kívánt vegyület neuroprotektív hatású volt agyi ischemia során.

Célkitűzés: Egy sejt-permeábilis calpain-inhibitor, az MDL-2817, hatásának vizsgálata a diffúz axonkárosodás két morfológiai jellemzőjére, a csökkent intraaxonális

transzportra (IAT) és a neurofilament kompakcióra (NFC).

Módszerek: A Marmarou-féle készülékkel kiváltott koponyatrauma előtt 30 perccel MDL-28170-t, vagy vivőanyagot (kontrol) iv-kapott patkányokat a trauma után 2 órával a szíven keresztül fixálószerrel perfundáltuk. A szagittális agytörzsi metszetek egy hányadán az IAT markerével (anti-APP), a szomszédos metszeten pedig az NFC markerével (RMO-14) immunhisztokémiát végeztünk. A károsodott axonok számát a kortikospinális pályában (CSpT) és a mediális hosszanti kötegben (MLF) összehasonlítottuk a kezelt és a kontrol patkányok vonatkozásában.

Eredmények: Az anti-APP-pozitív és az RMO-14-pozitív axon-profilok morfológiai jellemzőiben nem volt különbség megfigyelhető a kezelt illetve a kontrol patkányokban. A kvantitatív analízis szerint a trauma előtt végzett MDL-28170 kezelés szignifikánsan csökkentette az RMO-14-pozitív axonok számát mind a CSpT ($p < 0.02$), mind pedig az MLF területén ($p < 0.03$). Az anti-APP-pozitív axonok száma is statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott az MDL-28170-nel való kezelést követően mindkét vizsgált agytörzsi területen ($p < 0.03$ a CSpT estén és $p < 0.01$ az MLF esetén).

Következtetések: A calpain-gátlásnak az NFC kialakulására kifejtett jótékony hatása magyarázható a calpain-mediált spektrin-bontás és az NFC ismert kapcsolatával. Bár a legújabb kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az NFC és az IAT különböző axonpopulációkat érint, a calpain-gátlásnak az IAT-ra kifejtett pozitív hatása azt bizonyítja, hogy – ha a kompakció nem is társul transzport-zavarral – a calpain aktiválódása mindkét folyamatban jelentős szerepet játszik.

6. A trauma előtt illetve után iv- illetve icv-adott PACAP neuroprotektív hatásának vizsgálata; valamint a hatásos dózis megállapítása

Háttér: A PACAP számos neurotrófikus és neuroprotektív hatással rendelkezik *in vitro*. *In vivo* jótékony hatásának bizonyult mind a globális, mind a fokális agyi ischemia kezelésében, emellett traumás gerincvelő-sérülésekben, továbbá látóideg- illetve arcideg-átvágás esetén is. Az ischemiás és a traumás agykárosodás kialakulásában szerepet játszó – részben hasonló – mechanizmusokból kiindulva feltételezhető, hogy ez a vegyület traumás agykárosodás esetén is hatásos lehet.

Céltűzés: A PACAP esetleges neuroprotektív hatásának vizsgálata a traumás agysérülések során kialakuló diffúz axonkárosodásra; illetve a vegyület hatásos dózisának megállapítása.

Módszerek: (A) A Marmarou-féle készülékkel kiváltott koponyatrauma előtt PACAP-ot iv-kapott patkányokat 2 illetve 6 órával a koponyatrauma után perfúziósan fixáltuk, a szagittális agytörzsi metszeteket anti-APP immunhisztokémiával vizsgáltuk, a károsodott axonok számát a kezelt illetve a kontrol patkányokban a CSpT és az MLF területén összehasonlítottuk. (B) A hatásos dózis megállapítása céljából 1 μg , 10 μg és 100 μg PACAP-ot adtunk be az (A) kísérlet eredményeiből kiindulva icv; a túlélési idő 2 óra volt.

Eredmények: (A) Intravénás adagolás esetén – más KIR betegségekben hatásosnak bizonyult dózisban – a PACAP nem bizonyult neuroprotektívnek (sem a CSpT sem pedig az MLF területén nem csökkentette szignifikánsan az anti-APP immunpozitív axonok számát). (B) A PACAP intracerebroventrikuláris adagolásban 1 μg -os és 10 μg -os dózis esetén szintén nem bizonyult hatásosnak, 100 μg -os dózis azonban szignifikánsan csökkentette a CSpT területén talált anti-APP immunpozitív axonszakaszok számát ($p < 0.05$).

Következtetések: (1) A PACAP az apoptotikus és a gyulladásos mediátorok gátlása, illetve bizonyos mitokondriális enzimek befolyásolása révén fejthet ki neuroprotektív hatást. E folyamatok – mind az elsődleges, mind a másodlagos patológiás folyamatok következtében – traumás agysérülések esetén is megfigyelhetők. (2) Az intravénás adagolás sikertelensége abban keresendő, hogy – bár a PACAP bizonyítottan átjut a vér-agy gáton – transzportjának

mértéke az agytörzsben sokkal alacsonyabb, mint más agyterületeken. (3) Hasonlóan, az agytörzs területén a feltételezett alacsony mértékű liquor-agy transzport lehet a magyarázata a más kísérletekben tapasztaltabbaknál magasabb hatásos dózis igénynek icv alkalmazás esetén.

7. A terápiás ablak meghatározása icv PACAP-kezelés esetén

Háttér: Egy korábbi kísérlet szerint a koponyatrauma után *azonnal* icv-beadott PACAP csökkenti az axonális transzport fokális leállása által okozott axonkárosodást.

Célkitűzés: (A) A trauma kiváltását követően *késleltetve* icv-adott PACAP hatékonyságának tesztelése diffúz axonkárosodásban az intraaxonális transzportzavar és a neurofilament kompaktáció vonatkozásában; (B) továbbá a terápiás ablak meghatározása.

Módszerek: A Marmarou-féle készülékkel kiváltott koponyatrauma után 30 perccel illetve 1 órával 100 µg icv-beadott PACAP- vagy vivőanyag-kezelésben részesült patkányokat a traumát követően 2 órával perfundáltuk. A szagittális agytörzsi metszetek egy hányadán az IAT markerével (anti-APP), a szomszédos metszeteken pedig az NFC markerével (RMO-14) immunhisztokémiát végeztünk. A károsodott axonok számát a kortikospinális pályában (CSpT) és a mediális hosszanti kötegben (MLF) összehasonlítottuk a kezelt illetve a kontrol patkányok vonatkozásában.

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

Következtetések: (1) A koponyatrauma által okozott DAI progressziójának PACAP-kezeléssel való részleges gátlására jelentős nagyságú terápiás ablak áll rendelkezésre, ami a klinikai alkalmazhatóság alapfeltétele. (2) Az NFC-ra gyakorolt jótékony hatás elmaradása megerősíti azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint az IAT és az NFC részben különböző axon-populációkat érint, és kialakulásukban részben különböző mechanizmusok játszanak szerepet. (3) Az IAT-ra gyakorolt PACAP-hatás elmaradása az MLF területén valószínűleg annak köszönhető, hogy (i) az MLF területén sokkal kevesebb a károsodott axonok száma, mint a CSpT-ben, ami megnehezíti a statisztikai kimutathatóságot, illetve (ii) az MLF területén a traumát követően 2 órával az NFC-t mutató károsodott axon-profilok dominálnak.

8. A neuronális mechanoporáció, a resealing és a CMSP vizsgálata

Háttér: A koponyatrauma hatására ébredő intracerebrális erők a plazmamembrán mechanoporációját válthatják ki. Ez lehetőséget nyit arra, hogy az érintett idegsejtek nagy-mólsúlyú anyagokat tudjanak felvenni az extracelluláris térből, szemben más idegsejtekkel, amelyek ép plazma-membránja nem engedi át ezeket az anyagokat. A tartós permeabilitás-zavar az ion-homeosztázis felborulása – elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnövekedése – miatt, különböző enzimkaskádok – például a calpain – aktiválódása révén sejthalálhoz vezethet.

Célkitűzés: Annak a hipotézisnek a tesztelése, hogy (I) a mechanoporációt szenvedett neuronok egy része képes a sejtmembrán regenerációjára és a túlélésre, illetve, hogy (II) a permeabilitás-zavar calpain-aktiválódással és következményes spektrin-bontással társul a koponyatrauma által kiváltott diffúz idegsejt-károsodás esetén.

Módszerek: A koponyatrauma előtt illetve különböző idő elteltével a trauma után adott fluorescens festékkel konjugált, nagy-mólsúlyú dextrán icv infúziójával teszteltük a tartós permeabilitási zavar fennállását és az esetleges membrán-helyreállítódást. (A) Formalinos perfúziós fixálás és vibratómos metszés után konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a metszeteket. (B) Dextránnal-konjugált-festék ellenes antitest segítségével végzett

immunhisztokémia és EM-feldolgozás útján vizsgáltuk a permeabilitás-változással asszociált ultrastrukturális elváltozásokat. (C) CMSP kimutatására képes antitesttel végzett fluorescens immunhisztokémia után konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a permeabilitás-változás és a calpain-aktiválódás ko-lokalizációját. A calpain-asszociált ultrastrukturális elváltozások vizsgálatára a metszetek egy része EM feldolgozásra került. Kvantitatív analízist végeztünk a permeabilitás-változást és/vagy CMSP-t mutató idegsejtek arányának a vizsgált időpontokban való összehasonlítására.

Eredmények: A permeabilitás-változást szenvedett idegsejteknek kb. fele mutatott tartósan fennálló permeabilitási zavart a vizsgált időpontokban. E sejtek egy hányadánál súlyos sejtkárosodás jeleit észleltük, más hányaduk azonban csak minimális ultrastrukturális elváltozásokat mutatott. A tartós permeabilitási zavar csak kevesebb, mint 15 %-ban társult calpain aktiválódással. A sejtek egy részénél megtörtént a membrán helyreállítódása, ezek nem mutattak súlyos sejtkárosodás. Olyan idegsejtek is megfigyelhetők voltak, melyek késői permeabilitási zavart mutattak. A CMSP-t mutató sejtek kb. harmada nem szenvedett permeabilitás-változást. E sejtek moderált ultrastrukturális károsodást mutattak, a nekrotikus sejtek nagy részében CMSP nem volt kimutatható.

Következtetések: (1) A membrán-sérülés nem vezet feltétlenül gyors sejthalálhoz, mint ahogy azt korábban feltételezték. A membrán-regenerációt mutató sejtek mellett valószínűleg a tartós permeabilitási zavart mutató sejtek egy része is képes a regenerációra. (2) A késői permeabilitás-zavar hátterében a trauma után órákig tartó, mérsékelten emelkedett intrakraniális nyomásnak lehet szerepe. (3) Kvantitatív elemzéseink azt mutatják, hogy a túlélési idő növekedésével a membrán-sérülésben érintett neuronok között (elhúzódó permeabilitás-zavar, helyreállítódás, késői permeabilitási zavar) átrendeződés megy végbe, mely során a helyreállított-membránú neuronok egy hányadának újra kinyílik a membránja, míg a folyamatban korábban nem érintett neuronok egy hányada később permeabilitás-zavart szenvedhet. Ez a megfigyelés a késői permeabilitás-zavar jelentőségét hangsúlyozza, és felhívja a figyelmet a trauma által kiváltott másodlagos patológiás tényezők szerepére. (4) A membrán-sérülés nem feltétlenül szükséges vagy elegendő triggere a calpain aktiválódásnak, a trauma indukálta sejthalál –az adott időkereten belül – nincs feltétlenül összefüggésben a calpain aktiválódással.

9. A calpain- és caspase-aktiválódás szerepe a humán traumás agykárosodásban

Háttér: Habár a koponyatrauma által kiváltott fokális illetve diffúz agysérülések eltérő módon jönnek létre és klinikai manifesztációjuk is különböző, hasonló biokémiai folyamatok mindkét forma progressziójában szerepet játszhatnak. Ilyen például a calpain és a caspase aktiválódása. Ezek következtében specifikus spektrin-degradációs termékek (SBDP) felszaporodása figyelhető meg az agyszövetben mind állatkísérletekben, mind humán koponyatraumát követően, illetve kísérleti állatokban a cerebrospinális folyadékban (CSF).

Célkitűzés: (I) A calpain- és caspase-mediált folyamatok részvételének igazolása a humán koponyatraumában specifikus spektrin-degradációs termékeknek a humán CSF-ből (liquorból) való kimutatásával; (II) továbbá patomechanizmus-specifikus biokémiai markerek azonosítása céljából annak vizsgálata, hogy ezen termékek liquor-koncentrációja mutat-e összefüggést az agysérülés klinikai képével, például súlyosságával és kimenetelével

Módszerek: 12 súlyos koponyatraumát (GCS<9), 3 subarachnoidális vérzést (SAV) illetve 3 intraventriculáris vérzést (IVV) szenvedett, továbbá 3 agytumoros beteg – ICP kontroll céljából behelyezett icv katéteren keresztül lebecsátott – liquor-mintáin, illetve 5 diagnosztikus-célú lumbál-punkción átesett beteg liquor-mintáin a calpain- és caspase-specifikus SBDP-k kimutatására Western blottot végeztünk. A kapott eredményeket denzitometriás módszerrel hasonlítottuk össze. Néhány beteg esetén ezen kóros fehérjék jelenlétét a liquorban a traumától eltelt idő függvényében is meghatároztuk.

Eredmények: (A) A 280 kD molsúlyú intakt, és a 120 kD súlyú caspase-specifikus spektrin-degradációs termék a koponyatraumát szenvedettek szignifikánsan nagyobb hányadában volt jelen, mint más betegek esetén. A diagnosztikus lumbál-punkción átesett betegek CSF-mintái nem tartalmaztak SBDP-t. (B) Az intakt spektrin, valamint a 150 kD és a 120 kD nagyságú SBDP-k szintjét szignifikánsan magasabbnak találtuk koponyatrauma esetén, mint a vizsgált nem-traumás agysérülésekben. (C) A fehérjék liquor-szintje a trauma utáni 2-3. napon tetőzött, majd visszatért a kiindulási szintre, ezt követően egy újabb emelkedés volt tapasztalható. (D) A spektrin-szintek és a klinikai paraméterek összehasonítása során sem a súlyossági fokkal (GCS alapján), sem a kimenetellel (GOS alapján), sem pedig az ICP-emelkedés mértékével nem találtunk szignifikáns összefüggést.

Következtetések: (1) A lumbál-punkción átesett betegek esetén tapasztalt negatív eredmény igazolja, hogy az SBDP-k megjelenése a CSF-ban agysérülés és/vagy emelkedett intrakraniális nyomás következménye. (2) A koponyatrauma során – más ICP-emelkedéssel járó állapotokkal szemben – tapasztalt magasabb SBDP-szint arra utal, hogy a megfigyelt jelenség a sérülés direkt következménye, és nem az emelkedett ICP eredménye. (3) A vizsgált fehérjék liquor-szintjének jellegzetes idő-kinetikája alapján feltételezhető, hogy a calpain- és caspase-specifikus SBDP-k vizsgálata a jövőben hasznos patomechanizmus-specifikus biomarker lehet a koponyatraumát szenvedettek állapotának nyomon követésében.

III. A TÉMÁBAN ELÉRT, NEMZETKÖZI-JELENTŐSÉGŰ EREDMÉNYEK

1. Igazoltuk, hogy a koponyatrauma következtében kialakuló, argyrophil III-as típusú ezüstözési technikával festődő axonok azonosak a koponyatrauma következtében ultrastrukturális kompaktiót szenvedett axonokkal.
2. Kidolgoztunk egy olyan új koponyatrauma modellt, mely alkalmas az ultrastrukturális axon-kompaktió *szelektív* előidőzésére.
3. A kompaktálódott axonok sorsával kapcsolatban
 - (A) elsőként írtuk le a hónapok alatt lejátszódó morfológiai elváltozásokat,
 - (B) igazoltuk, hogy az érintett axonok >50%-a 1 napon belül, míg <10%-a 1 nap és 1 hét között regenerálódik, azaz visszanyeri eredeti ultrastrukturáját. A többi kompaktálódott axon néhány hónap alatt regenerálódik,
 - (C) megállapítottuk, hogy a kompaktálódott axonok az agykéregben több óra elteltével sem festődnek az agytörzsi axon-kompaktió kimutatására széles körben elterjedt markerrel, az RMO-14 antitesttel.
 - (D) nem mutatnak pozitivitást az IAT markerével, ami megerősíti azt az elképzelést, hogy az intraaxonális transzportzavar és az axon-kompaktió két különböző axon-populácót érint.
4. A traumás axon-kompaktió *mechanizmusának* vizsgálata során elsőként állapítottuk meg, hogy
 - (A) az ultrastrukturális axon-kompaktió a trauma pillanatában következik be, nem pedig 5-15 perces késéssel, ahogy azt korábban feltételezték,
 - (B) a citoskeletális kompaktió viszonylag hosszú, akár 1 mm-es axon-szakaszokra is kiterjedhet, azaz a korábbi feltételezésekkel ellentétben nem „fokális” elváltozás,
 - (C) az in-vivo és a post-mortem koponyatrauma egyforma morfológiai elváltozásokat eredményez, mind a (i) a hyperbasophilia, (ii) a III-típusú argyrophilia, (iii) a hiper-elektrondenzitás, mind pedig (iv) az ultrastrukturális kompaktió tekintetében,
 - (D) az ultrastrukturális axon-kompaktió foka a post mortem trauma esetén nem különbözik az in vivo trauma esetén meghatározottól,
 - (E) a trauma indukálta ezüstöződés minkét esetben „minden vagy semmi” jellegű, azaz az érintett szóma-dendrit domainek teljes egészére, illetve hosszú axon-szakaszokra terjed ki, de

általában nem egyazon idegsejt szoma-dendrit domainét és axonját érinti.

5. Kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy a sejt-permeabilis calpain-inhibitor, MDL-28170 szignifikánsan csökkenti az ultrastrukturális kompakciót szenvedett, illetve az intraaxonális transzport-zavart mutató axonok számát a TAI kialakulására jellegzetes agytörzsi régiókban, azaz a CSpT és az MLF területén.

6. Elsőként igazoltuk, hogy a PACAP traumás axonkárosodás esetén szignifikánsan csökkenti az intraaxonális transzport-zavart mutató axonok számát az agytörzsben.

7. Traumás axonkárosodás esetén kísérleteink során elsőként határoztuk meg PACAP-kezelés tekintetében

(A) a hatásos dózist

(B) a terápiás ablakot.

8. Kísérleteink során elsőként vizsgáltuk a koponyatrauma által kiváltott idegsejtmembrán permeabilitási zavar alakulását órákkal a traumát követően *in vivo* modellben. Elsőként igazoltuk, hogy

(A) a traumás sejtmembrán-károsodás a korábbi nézetekkel ellentétben, az idegsejtek egy részében nem vezet súlyos ultrastrukturális elváltozásokhoz és gyors sejthalálhoz,

(B) a tartós sejtmembrán permeabilitási zavar csak kevesebb, mint 15 %-ban társul calpain aktiválódással és következményes strukturális fehérjebontással,

(C) a károsodott sejtmembrán a sejtek egy részénél helyreállítódik, ezek a sejtek nem szenvednek súlyos sejtkárosodást,

(D) sejtmembrán permeabilitási zavar az idegsejtek egy részénél órákkal a traumát követően alakul ki, melynek hátterében feltételezhető a kísérleteik során észlelt tartósan 20 Hgmm körüli ICP emelkedés.

(E) A calpain aktiválódást és következményes CMSP-t mutató sejtek kb. harmada nem szenved permeabilitás-változást. E sejtek moderált ultrastrukturális károsodást mutatnak, a nekrotikus sejtek nagy részében CMSP nem igazolható.

(F) a túlélési idő növekedésével a membrán-sérülésben érintett neuronok között (elhúzódó permeabilitás-zavar, helyreállítódás, késői permeabilitási zavar) átrendeződés megy végbe, mely során a helyreállítódott-membránú neuronok egy hányadának újra kinyílik a membránja, míg a folyamatban korábban nem érintett neuronok egy hányada később szintén permeabilitás-zavart szenvedhet.

9. Kísérleteink során elsőként vizsgáltuk a calpain és caspase aktiváció és következményes strukturális fehérjebontás során létrejött spektrin degradációs termékek jelenlétét humán cerebroszpinális folyadékban. Megerősítettük, hogy

(A) a calpain- és caspase-aktiváció fontos pathobiokémiai tényező a traumás agykárosodás kialakulásában, továbbá elsőként igazoltuk, hogy

(B) a specifikus SBDP-k megjelenése a CSF-ben agysérülés és/vagy emelkedett intrakraniális nyomás következménye,

(C) az intakt spektrin, valamint a 150 kD és a 120 kD nagyságú SBDP-k CSF-szintje szignifikánsan magasabb koponyatrauma esetén, mint a vizsgált nem-traumás agysérülésekben.

(D) a spektrin degradációs termékek liquor-szintje jellegzetes idő-kinetikát mutat, azaz a trauma utáni 2-3. napon tetőzik, majd visszatér a kiindulási szintre, ezt követően egy újabb emelkedés tapasztalható.

(E) Kísérleteink nagyban hozzájárultak egy nemzetközi, multicentrikus, a PTE ÁOK Idegsebészeti Klinika részvételével folyó vizsgálat indításához, amely különböző biomarkerek azonosítása és diagnosztikus/prognosztikus jelentőségük felmérése céljából – több más fehérjével együtt – a spektrin degradációs termékek vizsgálatát is célul tűzte.

Az értekezést képező saját közlemények listája

1. Gallyas F, **Farkas O**, Mazlo M. Traumatic compaction of the axonal cytoskeleton induces argyrophilia: histological and theoretical importance. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002 Jan;103(1):36-42. **IF: 2.283**
2. Pal J, Toth Z, **Farkas O**, Kellenyi L, Doczi T, Gallyas F. Selective induction of ultrastructural (neurofilament) compaction in axons by means of a new head-injury apparatus. *J Neurosci Methods*. 2006 Jun 15;153(2):283-9. Epub 2005 Dec 27. **IF: 1.784**
3. Gallyas F, Pal J, **Farkas O**, Doczi T. The fate of axons subjected to traumatic ultrastructural (neurofilament) compaction: an electron-microscopic study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2006 Mar;111(3):229-37. **IF: 2.527**
4. Gallyas F, **Farkas O**, Mazlo M. Gel-to-gel phase transition may occur in mammalian cells: Mechanism of formation of "dark" (compacted) neurons. *Biol Cell*. 2004 May;96(4):313-24. **IF:2.233**
5. Buki A, **Farkas O**, Doczi T, Povlishock JT. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 attenuates traumatically induced axonal injury. *J Neurotrauma*. 2003 Mar;20(3):261-8. **IF: 2.587**
6. **Farkas O**, Tamas A, Zsombok A, Reglodi D, Pal J, Buki A, Lengvari I, Povlishock JT, Doczi T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept*. 2004 Dec 15;123(1-3):69-75. **IF: 2.531**
7. Tamas A, Zsombok A, **Farkas O**, Reglodi D, Pal J, Buki A, Lengvari I, Povlishock JT, Doczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006 May;23(5):686-95. **IF: 2.574**
8. **Farkas O**, Lifshitz J, Povlishock JT. Mechanoporation induced by diffuse traumatic brain injury: an irreversible or reversible response to injury? *J Neurosci*. 2006 Mar 22;26(12):3130-40. **IF: 7.506**
9. **Farkas O**, Polgar B, Szekeres-Bartho J, Doczi T, Povlishock JT, Buki A. Spectrin breakdown products in the cerebrospinal fluid in severe head injury--preliminary observations. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005 Aug;147(8):855-61. **IF:1.064**

Az értekezéshez nem kapcsolódó saját közlemények listája

1. Büki, A, **Farkas, O.**, Kövér, F., Dóczi T.,: A koponyasérülés által kiváltott axonkárosodás és kezelésének lehetőségei. (Therapeutic possibilities in axonal injury caused by head trauma. *Orvosi Hetilap* 2002, 143(10), 499-503.
2. Brian J Kelley, **Orsolya Farkas** and John T. Povlishock. Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultra-rapid secondary axotomy and wallerian degeneration. *Exp Neurol*. 2006 Apr;198(2):350-60. **IF:3.767**
3. Lückl J, Farkas O, Pál J, Kövesdi E, Czeiter E, Szellár D, Dóczi T, Komoly S, Büki A. Protein biomarkerek szerepe a koponyasérülés kísérletes modelljeiben és a klinikumban. *Ideggyogy Sz* 2007; 60(7-8):284-294.

Könyvfejezetek

1. **Farkas, O.**, Polgár, B., Büki, A, Szekeres-Barthó, J., Dóczi T.: Detection of Spectrin Breakdown Products in ventricular Cerebrospinal Fluid in Severe Traumatic Brain Injury In: *Proceedings of EMN, 2002*. Newcastle upon Tyne. Pg.:1-6.
2. A.Büki, E.Czeiter, **O.Farkas**, A.Zsombok, J.Pál, T.Dóczi and J.T.Povishock Development of Axonal Injury is Associated with the Impact and Survival Time. *Proceedings*

of EANS, ISBN 88-323-3150-0 2003; 649-652.

3. A.Büki, **O.Farkas**, Polgár B., Szekeres-Barthó J., A.Zsombok, J.Pál, T.Dóczi and J.T.Povlishock. Proteolytic Products in the Cerebrospinal Fluid in Traumatic Brain Injury. Proceedings of EANS, ISBN 88-323-3150-0 2003; 559-562.

Fontosabb előadások és poszter-presentációk

1. Büki, A., **O. Farkas**, G. Horvath, T. Dóczi. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 significantly prevents traumatically induced axonal injury. 16th Annual Symposium of the National Neurotrauma Society, San Diego, 2001. J. Neurotrauma, 2001;
2. **Farkas O.**, Büki, A., Dóczi, T.: A koponyatrauma által kiváltott diffúz axonális károsodás. A Magyar Neurotraumatológiai Társaság éves kongresszusa, Miskolc, 2001
3. **Farkas O.**, Büki, A., Dóczi, T.: Diffuse Axonal Injury – Novel Experimental Therapeutic Approaches. Second Annual Meeting of the Hungarian Society for Neurotraumatology, Miskolc, Hungary, May, 2002.
4. **Farkas O.**, Polgár, B., Büki, A., Szekeres-Barthó, J., Dóczi, T.: Detection of spectrin breakdown products in ventricular CSF after severe traumatic brain injury. 7th EMN Congress, Newcastle upon Tyne, England, 2002
5. Büki, A, **Farkas, O.**, Polgár, B., Szekeres-Barthó, J., Dóczi T., Povlishock J.T.: Calpain-mediated Spectrin Breakdown Products in ventricular Cerebrospinal Fluid in Severe Traumatic Brain Injury. 20th Annual Symposium of the National Neurotrauma Society (1st Joint Symposium, N-INTS), Tampa, FL, 2002., J. Neurotrauma, 2002; 19(10) 1343.
6. G. Horváth, **O.Farkas**, A. Büki, I. Lengvári, T. Dóczi. Role of gender differences in diffuse axonal injury. 2nd Pannonian Symposium on CNS Injury, Pécs, 2003.05.08-10.
7. Á. Péterfalvi, **O. Farkas**, A. Tamás, A. Zsombok, D. Reglödi, A. Büki, I. Lengvári and T. Dóczi Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in a rat model of diffuse axonal injury. 2nd Pannonian Symp. on CNS Injury, Pécs, 2003.05.08-10.
8. **O. Farkas**, A. Tamás, A. Zsombok, Á. Péterfalvi, D. Reglödi, A. Büki, I. Lengvári, T. Dóczi and J.T. Povlishock Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in a rat model of diffuse axonal injury. European Symposium on Neuroendocrinology, Göttingen, 2003.06.10.
9. A.Büki, **O.Farkas**, Polgár B., Szekeres-Barthó J., A.Zsombok, J.Pál, T.Dóczi and J.T.Povlishock Proteolytic Products in the Cerebrospinal Fluid in Traumatic Brain Injury. 12th European Congress of Neurosurgery (EANS), Lisbon (Portugal) September 7-12, 2003.
10. Richard H. Singleton, **Orsolya Farkas** and John T. Povlishock. Diffuse brain injury-mediated neuronal somatic plasmalemmal wounding: The effect of membrane disruption on neuronal reaction and fate. 21st Annual Symposium of the National Neurotrauma Society, Biloxi, 2003.
11. **Orsolya Farkas**, Richard H. Singleton and John T. Povlishock. Traumatic neuronal plasmalemmal disruption may be followed by membrane resealing or continued membrane disruption leading to necrotic cell death. Neuroscience, San Diego 2004.
12. **Orsolya Farkas**, Richard H. Singleton and John T. Povlishock Traumatic neuronal plasmalemmal disruption can lead to cell death not necessarily associated with concomitant calpain activation. 22nd Annual National Neurotrauma Society Symposium San Diego 2004.
13. A. Zsombok, **O. Farkas**, G. Horvath, A. Buki, T. Doczi and J. T. Povlishock. Female gender seems to be protected against diffuse axonal injury in a rat model of diffuse traumatic brain injury. 22nd Annual National Neurotrauma Society Symposium San Diego 2004.
14. **Farkas, O** and Povlishock JT. Mechanoporation: An Irreversible or Reversible Response to Injury. CNS Injury, 3rd Pannonian Symposium, Pecs, 2005.

15. **Orsolya Farkas**, Jonathan Lifshitz and John T. Povlishock. Trauma-Induced Mechanoporation: An Irreversible or Reversible Response to Injury. 23th Annual National Neurotrauma Symposium, Washington DC, 2005.
16. Tamás A., Zsombok A., **Farkas O.**, Reglődi D., Pál J., Büki A., Lengvári I., Povlishock JT, Dóczi T. Post-injury administration of PACAP attenuates traumatically induced axonal injury in rats. Neuroprotection in Neurological Diseases Giardini Naxos, Sicily, Italy, Nov-24-26, 2005.
17. **Orsolya Farkas**, MD, Traumatically Induced Neuronal Membrane Perturbation: Implications for Cell Injury and Death. Traumatic Brain Injury Seminars, Virginia Commonwealth University 2006. 04. 19., Richmond, VA
18. **Farkas, O**; Lifshitz J; Povlishock J.T.: Evolving Neuronal Plasmalemmal Change Following Diffuse Brain Injury. 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Netherland.. Journal Neurotrauma 2006, 23 (5): 748.
19. Lifshitz J; **Farkas O**; Kelley B.J; Dunn B.A; Povlishock J.T: Middle Fluid Percussion Injury in the Mouse: Potential Transgenic Utility in Diffuse Brain Injury. 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Netherland. Journal Neurotrauma 2006, 23 (5): 751.
20. Bukovics, P; **Farkas, O**; Pal, J; Czeiter, E; Szellar, D; Doczi, T; Povlishock J.T; Buki, A: The Effect of the Calpain Inhibitor MDL-28170 on Increased Axolemmal Permeability in a Rat Model of Diffuse Axonal Injury. 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Netherland. J. Neurotrauma 23 (5): 2006, 775.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt, hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Gallyas Ferenc Professor Úrnak és Dr. Büki Andrásnak a PhD éveim alatt nyújtott felbecsülhetetlen segítségükért, támogatásukért, bizalmukért, biztatásukért, konstruktív kritikáikért.

Köszönöm volt mentoromnak, Dr. Sándor Jánosnak, hogy elindított a tudomány rögzös útján, és azóta is szemeit rajtam tartva, töretlen bizalommal és biztatással kíséri végig tudományos életem alakulását.

Külön köszönet illeti John T. Povlishock Professor Urat, a Virginia Commonwealth University Anatómiai és Neurobiológiai Intézete vezetőjét, aki lehetővé tette, hogy 3 éven keresztül laboratóriumában dolgozhassam, és ott tartózkodásom ideje alatt illetve hazajövetelem óta is támogatásával és bizalmával tisztel meg.

Köszönöm Dóczi Tamás Professor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a PTE ÁOK Idegsebészeti Klinika kutató laboratóriumában folytathassam munkáimat.

Köszönet illeti a PTE ÁOK Idegsebészeti Klinikájának kutató laboratóriumában dolgozókat, név szerint: Nyirádi Józsefet, Andok Csabánét és Nádor Andrásné, illetve a Virginia Commonwealth University Anatómiai és Neurobiológiai Intézetének laboránsait, Lynn Davist és Sue Walkert az évek alatt nyújtott felbecsülhetetlen technikai segítségükért.

Köszönöm a PTE ÁOK Anatómiai Intézetéből Dr. Reglődi Dórának és Dr. Tamás Andreának közös munkáink során nyújtott együttműködését.

Köszönöm a Pécsi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinika intenzív osztályán dolgozóknak a súlyos koponyatraumás betegek liquor- és vér-mintagyűjtésében nyújtott segítségét. Továbbá köszönöm a PTE ÁOK Mikrobiológiai Intézetében dolgozóknak, elsősorban Dr. Szekeres Júlia Professor Asszonynak, Dr. Polgár Beátának és Kiss Ágnesnek, e minták feldolgozásában való áldozatos közreműködését.

Köszönetet mondok végül, de nem utolsó sorban minden kedves volt és jelenlegi kollégámnak, családomnak és barátaimnak a sok biztatásért és lelki támaszért.

DIFFUSE AXONAL AND NEURONAL INJURY EVOKED BY TRAUMATIC BRAIN INJURY: PATHOMECHANISM AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICAL INTERVENTIONS

I. INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is an important public health problem in the developed world; it represents the leading cause of death in the population aged under 40. According to the WHO, 10 million head injuries resulting in either death or hospital admission occur every year in the world, and approximately 57 million people sustain TBI at least once in their life. In Hungary, approximately 14 000 TBI occur every year, 71.3% of them are considered mild, 19.4% moderate and 9.4% severe. Fifty-five % of trauma patients die during the acute management. Among the survivors, 40% are discharged in a permanently vegetative state or have permanent disabilities, only 45% recover fully or with mild disability.

Traumatic brain injuries represent a very heterogeneous disease group. The objective of the present dissertation was to investigate diffuse axonal and neuronal injuries in animal models and to study human TBI based on the results of experimental studies.

“Diffuse axonal injury (DAI)” refers to the phenomenon of primary damage to axons scattered throughout the brain among normal axons in a widespread distribution in an otherwise normal parenchymal environment. The significance of DAI is highlighted by the fact that it is responsible for 50% of permanent comatose state and 35% of mortality in TBI cases without space occupying mass lesions. Traumatic axonal injury (TAI), the experimental-animal equivalent of DAI, has two distinct morphological consequences: axonal swelling/axonal bulb formation (AS/B) and ultrastructural compaction (UC). AS/B results from the impairment of the anterograde axonal transport evoked by TBI. It can be detected by immunohistochemistry using antibodies against certain substances accumulating at the sites of impaired axonal transport. The most widely used method is the detection of amyloid precursor protein (APP), which has become the gold standard for the diagnosis of DAI. The phenomenon of UC was described only in the nineties. Originally, it was assumed that UC and AS/B occur in the same damaged axons. By today, however, it has become clear that, in most cases, these two morphological changes occur in different axon populations and rarely within the same axon. The histological detection of UC is usually carried out by using antibodies against the medium sized neurofilament subunit (NF-M), which becomes accessible for antibodies (e.g. RMO-14) as a result of calpain mediated structural proteolysis evoked by increased Ca^{2+} concentration after TBI. RMO-14, however, can detect UC only at least 15 minutes following TBI. On the other hand, a special silver method can demonstrate argyrophil axonal damage with decreased axonal caliber immediately after TBI or even in the case of post-mortem TBI. This phenomenon might be the light microscopic equivalent of UC and questions the exclusive role of enzyme mediated processes in the pathogenesis of UC.

In the past two decades, many studies investigated DAI evoked by TBI. The potential, however, that forces of injury can also directly cause mechanically induced neuronal damage or death has received little attention. According to the most recent investigations, TBI can evoke plasma membrane disruption (“mechanoporation”) not only in axons but also in neuronal somata in the neocortex, hippocampus and thalamus. Such neurons can display very heterogeneous morphological characteristics ranging from fast necrosis to minor ultrastructural alterations. The fact that membrane disruption does not necessary lead to cell death is indicative of a fast membrane-resealing process. Investigations, however, to explore this process has not been performed before.

II. EXPERIMENTS

1. Association of the ultrastructural axon compaction with the argyrophil axonal damage.

Background: Following TBI evoked by different methods, (i) a special and reproducible silver method stains long axon segments distributed diffusely among normal axons, and (ii) by electron microscope, ultrastructural (neurofilament) compaction can be detected in axons scattered among non-compacted axons in a visibly intact environment.

Objective: To investigate the possibility that the argyrophil axonal damage is the light-microscopic manifestation of ultrastructural compaction.

Methods: TBI was evoked by an impact-acceleration head injury device described by Marmarou et al. Animals were transcardially perfused immediately after TBI. The brains were removed one day later and sectioned coronally with a vibratome at a thickness of 150 μm . Every fifth section was stained with silver. Experiment (A): Regions of silver stained sections containing argyrophil axons were processed for EM (osmification, Durcupan embedding, ultra-sectioning, contrasting). Experiment (B): The same regions of non-stained sections were osmificated, embedded and sectioned at a thickness of 1 μm ; these were silver-stained, re-embedded, ultra-sectioned and contrasted.

Results: Experiment (A): Certain steps of the silver staining method damaged the ultrastructure, loosened the layers of the myelin sheaths and completely disintegrated the ultrastructure of normal axons. On the contrary, the compacted axons became homogenous and thereby visible in the electron microscope. Silver grains could be detected only in compacted axons, while no compacted axonal profiles were found without containing silver grains. Experiment (B): Since the silver staining was performed following osmification and embedding, the ultrastructure remained well preserved. Several silver grains could be detected in compacted axons, while no compacted axons were found without silver grains.

Discussion: (1) The silver method used here can be utilized for detecting compacted axons by light microscopy. Because of the high selectivity and low background staining of this method, compacted axons can easily be located even in 150- μm thick vibratome sections; thereby it could be instrumental in mapping the distribution of compacted axons throughout the brain and in locating areas that are suitable for investigation by means of electron-microscopy or other techniques. (2) UC occurs at the moment of TBI, in contrast with previous assumptions that postulate a 5-15 minute delay. (3) UC extends up to 1-mm-long axonal segments, i.e. it is not a “focal” damage in the ultrastructure as it was previously believed.

2. Selective induction of ultrastructural compaction in axons by a new head injury device

Background: Traumatic axonal injury evoked by TBI has two distinct morphological characteristics: (i) axonal swelling/bulb (AS/B) formed by focal impairment of the anterograde axonal transport and (ii) ultrastructural compaction (UC) that induces argyrophilia. While AS/B is well known in human light-microscopic pathology, the significance of UC has not been discussed in human DAI. The widely-used TBI models produce various morphological responses in the same brain, thereby allowing the investigation of their cumulative consequences. Individual morphological responses, such as ultrastructural compaction in axons, however, cannot be selectively investigated by them.

Objective: To develop a TBI paradigm by which ultrastructural compaction can be selectively investigated without the influence of other morphological responses.

Methods: A new head injury device was elaborated by which a depression of controlled depth can be produced on the exposed skull. Animals were sacrificed by

transcardial perfusion with a formaldehyde or a glutaraldehyde fixative either immediately after head injury evoked by this new device or 2 h or 4 h later. Respiratory rate, heart rate, blood pressure and intracranial pressure were monitored before and after injury. Brains were removed 1 day later and sectioned with a vibratome. Every third formalin-fixed section was stained with silver, or processed for APP or RMO-14 immunohistochemistry. The same regions of glutaraldehyde-fixed sections were processed for electron microscopy.

Results: In the case of a 0.75 mm depression, the monitored physiological parameters returned to the normal range within 1 min following head injury. Argyrophilic and compacted axons could be demonstrated only in the neocortex under the impact site. They were scattered among normal axons in a visibly normal parenchymal environment. Other morphological alterations could not be observed. The number of damaged axons changed depending on the depth of the depression. Immediately after the head injury or 1 h later, damaged axons were stained homogeneously with silver, whereas 4 h post-injury, the silver staining became dotted. Axons showing impaired axonal transport (APP positivity) could be detected only in the case of depression 1 mm or deeper. RMO-14 positivity could not be observed in any case.

Discussion: (1) In the case of 0.75 mm depression, the new head injury device is suitable for the selective investigation of UC, thereby allowing the examination of the fate of compacted axons without the influence of other morphological or physiological consequences of head injury. (2) The lack of APP-positivity is in accordance with the theory that impaired axonal transport and UC affect different axon populations. (3) Compacted axons in the neocortex cannot be stained with RMO-14, the widely used marker of axonal compaction in the brainstem. The probable explanation of this phenomenon is that, in contrast with the large-caliber, myelinated axons, the thin axons, such as those damaged in our experiment, contain only a very small amount of the NF-M subunit. RMO-14 is known to target the “rod domain” of this subunit after it becomes accessible as the result of calpain activated proteolysis initiated by TBI.

3. The fate of axons subjected to traumatic ultrastructural compaction in a head injury model of selective ultrastructural compaction

Background: It has been demonstrated that ultrastructural axon compaction is one of the morphological consequences of TAI. The fate of compacted axons, however, has not been previously investigated. It has also been demonstrated that a considerable proportion of neurons sustained UC recover spontaneously, while others die. Considering that presumably the same processes take place in axonal and neuronal UC (see section 4), it is reasonable to assume that a proportion of traumatically compacted axons may also undergo spontaneous recovery.

Objective: To investigate the fate of compacted axons in a new head injury model capable of evoking selective ultrastructural axon compaction (see section 2).

Methods: Rats suffering a 0.75-mm skull depression were sacrificed immediately after head injury or at various time points up to 6 months post-TBI by transcardial perfusion of a glutaraldehyde fixative. A proportion of brain sections were silver-stained, while nearby sections were processed for EM. Compacted and non-compacted myelinated axons were counted for quantitative assessment.

Results: The number of compacted axons was more than two times higher in animals sacrificed immediately after the injury than in those survived for 1 day or 1 week. In cases of immediate perfusion or 4-h survival, numerous axon profiles displaying ultrastructural compaction were observed. At longer post-TBI times, various other ultrastructural alterations were observed: (i) Membranous whorls appeared in axons with otherwise normal ultrastructure in the first 2 days. (ii) The ultrastructure of compacted axons became homogenized in 1 week. (iii) The homogenized axonal interior became convoluted or

fragmented in 1 month, (iv) later the fragments were replaced presumably with oligodendrocyte cytoplasm, (v) and finally axolemma-bound, neurofilament-containing profiles were observed within myelin sheaths containing abundant oligodendroglia cytoplasm. It should be emphasized that macrophage infiltration, microglial proliferation or signs of advanced Wallerian degeneration could not be observed even in rats survived 6 months.

Discussion: (1) More than 50 % of compacted axons recover within 1 day post-TBI, while another 10 % recover between 1 day and 1 week. The EM sign of spontaneous recovery is the presence of whorls within otherwise normal axons. (2) The majority of other compacted axons regenerates during several months (see Results (ii)-(vi)). (3) These processes presumably play some role both in the fast (within days) and in the slow (within months) physical and/or mental improvement of patients suffering TBI. (4) The reason of the absence of the Wallerian degeneration is presumably that the myelin sheaths around the compacted axons remain intact and connected to the feeding oligodendrocytes, ensuring guiding tubes for the regenerating axons. (6) The utilized head injury model does not evoke permanent perturbations in the physiological parameters. This can be the reason for the high rate of spontaneous recovery and for the reversibility of degeneration.

4. Mechanism of the ultrastructural compaction in axons and neurons

Background: Different pathobiological conditions including hypoglycemia, ischemia, epilepsy, and physical forces such as electroshock or brain trauma can evoke similar morphological responses, including ultrastructural compaction. It is well known that the same alterations can occur post mortem in the brain due to mechanical forces during the removal of non-fixed or not properly fixed brains from the skull. The similar morphology suggests similar mechanism in the formation of UC, whereas the fact that it can occur post mortem indicates non-enzyme-mediated processes. Gel-to-gel phase transition, known from polymer chemistry, is a process independent of the inducing force, propelled by the difference in energy stored in non-covalent bonds and can spread throughout the gel when initiated at a single point. It has already been suggested to play essential roles in certain activities of the living cell.

Objective: (1) To compare the morphological characteristics of neuronal and axonal compaction caused by in-vivo head injury with those caused by post mortem, under conditions extremely unfavorable for enzyme mediated processes. (2) Confirmation of the hypothesis that the mechanism of UC is gel-to-gel phase transition, in respect of both energy and structure.

Methods: TBI was evoked by the Marmarou head-injury device either in vivo or post mortem after a 30-min transcardial perfusion with a glutaraldehyde fixative followed by cooling to app. 0 °C. In the case of in vivo TBI, animals were perfusion fixed immediately post-injury. A proportion of brain sections were silver stained, while neighboring sections were processed for EM. For quantitative assessment, the average distance between the longitudinal ultrastructural elements was calculated both in the compacted and the non-compacted axons.

Results: (A) Evoked either in vivo or post mortem, TBI resulted in similar morphological alterations regarding (i) hyperbasophilia, (ii) type III argyrophilia, (iii) hyper electron density and (iv) UC. (B) The degree of UC in the cases of post mortem head injury did not differ from the degree of UC evoked by in vivo head injury. (C) Argyrophilia induced by either in vivo or post mortem displayed an “all-or-nothing” nature with the next stipulations: it involved either the entire soma-dendrite domains of the affected neurons but not their axons or it extended to long axonal segments but not to their parent neurons.

Discussion: Enzyme-mediated processes cannot play any role in the pathomechanism

of ultrastructural compaction either in neurons or axons, considering that (1) it is highly improbable that any complex enzyme-mediated process would result in the same morphological alterations under both optimum and extremely unfavorable conditions. (2) The all-or-nothing nature can be explained only by the assumption that the compaction spreads throughout each affected soma-dendrite domain or axon from a single initiation point. It is impossible that a head injury would simultaneously produce UC at each point of a number of randomly distributed neuronal soma-dendrite domains and axons and, at the same time, would spare all points of the neighboring soma-dendrite domains and axons. It also appears highly unlikely that any complex enzyme-mediated process would spread over long intracellular distances without fading under the extremely unfavorable conditions applied in our post mortem experiment.

To explain the mechanism underlying UC, we hypothesized that a continuous gel structure, with a matrix composed of protein molecules not belonging to the conventional ultrastructural elements (organelles, cytoskeleton), fills the spaces between the ultrastructural elements, stores free-energy in the form of non-covalent bonds and is capable of phase transition at the expense of the stored energy. The phase transition (co-operative conformational change of the protein molecules building up the gel matrix), is accompanied by the release of K^+ ions resulting in hyperbasophilia and by the release and elimination (pressing out) of bound water molecules resulting in volume reduction and ultrastructural compaction. Gel-to-gel phase transition, known from polymer chemistry, can be initiated both by physical and chemical injuries and can be reversible, in accordance with the similar abilities of “dark” neurons and axons.

5. The effect of a cell-permeable calpain inhibitor (MDL 28170) on traumatic axonal injury

Background: The alterations in axolemmal permeability evoked by TBI (“mechanoporation”) lead to the activation of calpain due to increased intracellular Ca^{2+} concentration. Calpain activation results in partial proteolysis of the axonal cytoskeleton and subsequent neurofilament compaction (NFC). In focal (contusional) brain injury models, inhibition of calpain reduced the cytoskeletal changes in the neocortex and improved the behavioral outcome. MDL 28170 has been found neuroprotective in brain ischemia.

Objective: To determine whether MDL 28170 attenuates traumatically induced axonal damage in terms of impaired axonal transport (IAT) and neurofilament compaction (NFC).

Methods: TAI was induced by the impact-acceleration head injury device described by Marmarou et al. MDL 28170 or its vehicle was administered intravenously 30 min pre-injury. Animals were sacrificed 2 h post-injury by transcardial perfusion. Brainstems were sectioned sagittally with a vibratome at a thickness of 40 μ m. Half of the sections were processed for APP immunohistochemistry to detect IAT, while neighboring sections were stained with RMO-14 for the detection of NFC. The number of damaged axons were compared in the corticospinal tract (CSpT) and in the medial longitudinal fascicle (MLF) both in MDL 28170-treated and vehicle-treated animals.

Results: In the MDL 28170-treated group, both the localization and the appearance of APP and RMO-14 immunopositive axonal profiles were similar to those observed in the vehicle-treated group. According to the quantitative assessment, pre-injury administration of MDL 28170 significantly reduced the mean number of RMO-14-immunoreactive axons both in the CSpT ($p < 0.02$) and the MLF ($p < 0.03$). Similarly, MDL 28170 significantly reduced the number of APP-positive axonal profiles both in the CSpT ($p < 0.03$) and the MLF ($p < 0.01$).

Discussion: The beneficial effect of calpain-inhibition on NFC can be explained by the well known association between calpain-mediated spectrin proteolysis and NFC. Although, the most recent studies revealed that NFC and IAT affect different axon

populations, the protective effect of calpain inhibition on IAT suggests that, even if NFC does not accompany IAT, the activation of calpain takes place in the mechanisms of both pathological processes.

6. Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptid (PACAP) on traumatic axonal injury

Background: PACAP has several in vitro neurotrophic and neuroprotective effects. In vivo, it proved effective in the treatment of focal and global cerebral ischemia, as well as, in traumatic spinal cord injury, optic nerve injury and facial nerve injury. Considering the partially similar subcellular mechanisms taking place in the pathogenesis of cerebral ischemia and TBI, PACAP-treatment is assumed to be neuroprotective in TAI, as well.

Objective: To investigate whether PACAP attenuates traumatically-induced axonal injury in terms of impaired axonal transport (IAT).

Methods: TAI was induced by the impact-acceleration head injury device described by Marmarou et al. (A) PACAP or its vehicle was administered intravenously immediately before head injury. Animals were sacrificed either 2 h or 6 h post-injury by transcardial perfusion. Brainstems were sectioned sagittally with a vibratome at a thickness of 40 μm . Sections were processed for immunohistochemistry with anti-APP antibody to detect IAT. The number of damaged axons was compared in the corticospinal tract (CSpT) and in the medial longitudinal fascicle (MLF) both in the PACAP-treated and the vehicle-treated animals. (B) Based on the results of the previous experiment (A), 1 μg , 10 μg or 100 μg PACAP was administered intracerebroventricularly, to determine its effective dose.

Results: (A) Using intravenous administration, PACAP, in the dose that has proved effective in the treatment of cerebral ischemia, did not exert neuroprotective effects on TAI, i.e. did not reduce significantly the number of APP-positive axons in the CSpT or in the MLF. (B) Intracerebroventricular administration of 1 μg and 10 μg of PACAP did not exert neuroprotection. To the contrary, 100 μg PACAP significantly reduced the number of APP-immunoreactive axonal profiles in the CSpT ($p < 0.05$).

Discussion: (1) PACAP can exert neuroprotection by inhibiting apoptotic and inflammatory mediators, as well as, by activating certain mitochondrial enzymes. These processes also take place in the pathogenesis of TBI, both in the primary and the secondary pathological processes. (2) The cause underlying the lack of effect in the case of intravenous administration is presumably the significantly lower rate of PACAP-transport through the blood-brain barrier in the area examined in the present study, as compared to other regions of the brain studied previously. (3) Similarly, the assumed lower rate of passage within the brainstem can be responsible for the relatively high concentration required to exert axonoprotection.

7. Therapeutic window of PACAP-treatment in traumatic axonal injury

Background: In the above study, PACAP-treatment was found to be neuroprotective in traumatically-induced axonal injury.

Objective: To investigate the neuroprotective effects of delayed PACAP administration on traumatically induced axonal injury in terms of impaired axonal transport (IAT) and neurofilament compaction (NFC), and to determine the therapeutic window.

Methods: TAI was induced by the impact-acceleration head injury device described by Marmarou et al. 100 μg PACAP or its vehicle was administered intracerebroventricularly either 30 min or 1 h post-injury. Animals were sacrificed 2 h post-injury by transcardial perfusion. Brainstems were sectioned sagittally with a vibratome at a thickness of 40 μm . Half of the sections were processed for immunohistochemistry with anti-APP antibody to detect IAT, while neighboring sections were stained with RMO-14 for the detection of NFC. The

number of damaged axons were compared in the corticospinal tract (CSpT) and in the medial longitudinal fascicle (MLF) both in PACAP-treated and vehicle-treated animals.

Results: Intracerebroventricular administration of 100 µg PACAP significantly reduced the number of APP-immunopositive axonal segments in the CSpT both 30 min and 1 h post-injury ($p < 0.001$). The PACAP-treatment, however, did not have neuroprotective effects on IAT in the MLF or on NFC in any examined brain area, at any time point.

Discussion: (1) A considerable therapeutic window is available for the use of PACAP in the treatment of traumatically induced axonal injury, which is required for potentially useful clinical interventions. (2) The lack of beneficial effects of PACAP-treatment on NFC is in accordance with previous observations indicating that IAT and NFC affect different axon populations. (3) The lack of effect on IAT in the MLF can be explained by the facts that (i) in the MLF, the number of damaged axons is significantly smaller than in the CSpT, resulting in less statistical power in establishing significant differences, and (ii) in the MLF, 2 h post-TBI, damaged axons demonstrating NFC are more frequent than those showing IAT.

8. Neuronal mechanoporation, resealing and CMSP induced by diffuse TBI

Background: Traumatic brain injury evokes direct mechanical poration of the neuronal plasma membrane allowing the uptake of high-molecular-weight tracers normally excluded from the cytoplasm by the intact cell membrane. Permanent membrane permeability perturbation leads to the activation of different enzyme cascades, including calpain, due to the influx of damaging ions, resulting in neuronal death.

Objectives: To investigate the hypothesis that (I) a proportion of neurons sustaining mechanoporation is capable of membrane repair and therefore survives and (II) membrane permeability perturbations are accompanied by calpain activation and subsequent spektrin proteolysis following diffuse traumatic brain injury.

Methods: Enduring membrane permeability perturbations and potential membrane repair were evaluated by the icv-infusion of high-molecular-weight fluorescent dextrans administered either pre-injury or at different time points post-TBI. TBI was evoked by the impact acceleration head injury apparatus; animals were sacrificed by transcardial perfusion of a formaldehyde fixative. (A) Vibratome sections were examined by confocal microscopy. (B) Antibodies against the fluorescent dyes conjugated to the infused dextrans were used to evaluate the ultrastructural alterations associated with membrane permeability perturbations. (C) The co-localization of membrane disruption and CMSP was evaluated by triple-labeled fluorescent immunohistochemistry using antibodies against calpain-specific SBDPs. A proportion of brain sections were processed for EM to investigate ultrastructural alterations associated with calpain activation. Quantitative analysis was performed to compare the number of neurons demonstrating membrane permeability perturbations and/or CMSP at different time points post-injury.

Results: Approximately 50 % of neurons showing any membrane permeability alteration demonstrated enduring membrane perturbation. A proportion of these neurons showed severe ultrastructural damage, while others displayed little or no pathological change. Enduring membrane perturbation was associated with CMSP in less than 15 %. Several neurons demonstrated membrane resealing, these neurons did not show overt ultrastructural damage. Neurons demonstrating delayed membrane disruption could also be observed. One third of the neurons showing CMSP did not demonstrate any membrane perturbation. These neurons did not show severe ultrastructural alterations, while those with overt ultrastructural damage did not demonstrate CMSP.

Discussion: (1) In contrast with previous assumptions, membrane disruption evoked by diffuse TBI does not necessary lead to rapid cell death. Apart from neurons with obvious membrane resealing, a proportion of neurons showing enduring membrane disruption are

presumably also capable of membrane repair. (2) Elevated intracranial pressure several hours post-TBI might be the reason underlying delayed membrane disruption. (3) According to the quantitative assessment, an over time redistribution may occur between the neuron populations showing different membrane permeability alterations (enduring membrane perturbation, membrane resealing, delayed membrane disruption). Specifically, a proportion of primarily mechanoporated neurons whose membrane resealed in the early post-injury period may suffer later secondary membrane re-opening, which converts them to those which display primary enduring membrane perturbation. Furthermore, with increased survival time, proportionally more neurons suffer delayed membrane perturbation. This underlines the significance of delayed membrane disruption and the role of secondary pathological factors induced by diffuse TBI. (4) Our results emphasize the need for caution in interpreting the occurrence of CMSP and its overall implications for neuronal injury and death following diffuse TBI.

9. The role of calpain and caspase-3 activation in the pathomechanism of human traumatic brain injury

Background: Although focal and diffuse traumatic brain injuries are evoked by different mechanisms and their clinical manifestations can be different, similar biochemical cascades, including increased pathological activation of calpain and/or caspase-3 can take part in their pathobiology. As a result of these processes, the accumulation of specific spectrin breakdown products (SBDP) has been detected in the brain tissue and cerebrospinal fluid of head-injured experimental animals and in the brain tissue of human victims of accidents.

Objectives: (I) To investigate the role of calcium-induced, calpain- and caspase-mediated structural proteolysis in the pathobiology of TBI, and (II) to identify potential biomarkers specifically associated with the pathological processes evoked by TBI, in order to determine the biochemical severity of the head injury, to predict the outcome of severely brain-injured patients and to help their clinical management.

Methods: Ventricular CSF samples of 12 severe TBI-patients with raised intracranial pressure (ICP) were processed. As controls, CSF samples were also obtained from 9 patients with non-traumatically elevated ICP and from 5 patients undergone diagnostic lumbar puncture that proved negative for a neurological disease (DLP patients). The presence of intact spectrin and calpain- or caspase-specific SBDPs were assessed by means of Western blot analysis of CSF samples collected once a day over a several-day period. Parameters of severity and outcome such as ICP, Glasgow Coma Scale and Glasgow Outcome Scale were also monitored in order to reveal a potential correlation between the clinical parameters and the CSF markers.

Results: (A) Intact spectrin and 120 kD SBDP were significantly more frequent in the CSF samples of head injury patients than in patients with non-traumatically elevated ICP. In the DLP patients none of the SBDP proteins could be detected. (B) The CSF levels of intact spectrin, 150 kD and 120 kD SBDPs were significantly higher in patients suffering TBI than in the others. (C) (2) Elevated intracranial pressure several hours post-TBI might be the reason underlying delayed membrane disruption. (D) Significant association between CSF levels of SBDPs and severity of injury (as assessed by GCS), outcome (GOS) or elevated ICP could not be demonstrated.

Discussion: The fact that CSF samples of the DLP patients proved negative for any of the investigated proteins indicates that their accumulation is associated with traumatic brain injury and/or elevated ICP. (2) The finding that intact spectrin and SBDPs reached significantly higher levels in TBI than in other pathological conditions associated with comparably elevated ICP, indicates that these changes were in direct response to the injury

and not a secondary response to intracranial hypertension. (3) The observed specific time course of SBDP-levels in the CSF indicates that, in the future, monitoring these biomarkers might furnish important information for the management of TBI patients.

III. SUMMARY OF THE MOST IMPORTANT RESULTS

- 1.** Our studies were the first to demonstrate that, in axons, type III argyrophilia induced by TBI is the light microscopic manifestation of ultrastructural compaction.
- 2.** We developed a new head injury device suitable for the selective induction of traumatic ultrastructural compaction in axons.
- 3.** With the aid of the new head injury device, our studies were the first to describe
 - (A)** the morphological changes taking place in axons that have undergone traumatically-induced ultrastructural compaction. We also demonstrated that
 - (B)** that more than 50 % of the compacted axons regenerate within 1 day post-TBI, while another 10 % recover (regain the normal ultrastructure) between 1 day and 1 week. The majority of other compacted axons recover during a few months,
 - (C)** that the compacted axons in the neocortex do not display RMO-14 positivity, the widely used marker of NFC in the brainstem, even several months post-TBI.
 - (D)** that the compacted axons in the neocortex do not display IAT, confirming the assumption that IAT and UC (NFC) affect different axon populations.
- 4.** Regarding the pathomechanism of traumatic axon compaction, our studies were the first to demonstrate that
 - (A)** traumatic axon compaction occurs at the moment of injury, in contrast to the 5-15-min delay thought previously,
 - (B)** ultrastructural compaction can affect even 1-mm-long axon segments, i.e. it is not a “focal” alteration in the ultrastructure of the affected axons, as it was previously thought,
 - (C)** both in-vivo and post-mortem head injuries result in similar ultrastructural changes regarding (i) hyperbasophilia, (ii) type III argyrophilia, (iii) hyper electro-density and (iv) ultrastructural compaction,
 - (D)** the degree of post mortem-evoked axonal ultrastructural compaction does not differ from that evoked in vivo,
 - (E)** argyrophilia induced by TBI demonstrates “all or nothing” nature, i.e. it extends to the entire soma-dendrite domain of the affected neuron or affects long axonal segments; but it does not usually affect the soma-dendrite domain and axon of the same neuron.
- 5.** Our studies were the first to demonstrate that MDL-28170, a cell-permeable calpain inhibitor, significantly decreases the number of damaged axons showing UC and/or IAT in the CSpT and in the MLF following TBI.
- 6.** Our studies were the first to demonstrate that PACAP significantly decreases the number of damaged axons showing IAT in the brainstem following TBI.
- 7.** Regarding the PACAP-treatment following TBI, we were the first to define
 - (A)** its minimal effective dose and
 - (B)** its therapeutic window.
- 8.** Our studies were the first that investigated delayed neuronal plasma membrane perturbations following diffuse TBI. We were the first to demonstrate that
 - (A)** in contrast with previous assumptions, membrane disruption evoked by TBI does not necessary lead to severe ultrastructural damage and rapid cell death,
 - (B)** enduring membrane perturbation is associated with calpain activation and subsequent CMSP in less than 15 % of the affected neurons,
 - (C)** the disrupted cell membrane reseals in a proportion of the affected neurons and these

neurons do not undergo severe cell damage,

(D) cell-membrane permeability perturbation occurs several hours following TBI in a proportion of neurons. Permanent ICP elevation may contribute to the observed delayed membrane disruption.

(E) One third of the neurons demonstrating calpain activation and subsequent CMSP do not sustain any membrane permeability alteration. Such neurons demonstrate moderate ultrastructural damage; the majority of necrotic neurons do not show CMSP.

(F) With the increase of the survival time, redistribution may occur between neurons demonstrating different membrane permeability perturbations (enduring membrane perturbation, resealing or delayed membrane disruption). Specifically, a proportion of primarily mechanoporated neurons whose membrane resealed in the early post-injury period may suffer later secondary mechanoporation, which converts them to those neurons displaying primary enduring membrane perturbation. Furthermore, with increased survival time, proportionally more neurons suffer delayed membrane perturbation. This underlines the significance of delayed membrane disruption and the role of secondary pathological factors induced by diffuse TBI.

9. Our studies were the first to investigate the accumulation of intact spectrin and calpain- or caspase-specific SBDPs in the CSF of patients with severe TBI. We have confirmed that

(A) calpain- and caspase-activation has an important role in the pathomechanism of human TBI. We were the first to demonstrate that

(B) the appearance of intact spectrin and SBDPs in the CSF are the result of brain injury and/or elevated ICP,

(C) the CSF levels of intact spectrin as well as 150 kD and 120 kD SBDPs are significantly higher in TBI than in other neurological diseases,

(D) the CSF level of SBDPs shows a specific time course; it peaks on the 2nd-3rd day post-TBI, following by a decrease to the baseline level with a subsequent secondary increase.

(E) Our studies significantly contributed to the launching and accomplishment of an international, multicentric study which involves the University of Pécs, Department of Neurosurgery. This study is aimed to identify specific biochemical markers and to evaluate their diagnostic/prognostic significance in the management of severe TBI.