

Szakmai zárójelentés OTKA PD 72240

Az OTKA PD 72240 számú kutatási támogatás segítségével 2008. szeptember 1-től 2011. december 31-ig 9 tudományos publikációban (IF: 22,821), illetve hazai és nemzetközi konferenciákon 6 idézhető absztraktban (poszter prezentációban) ismertettük azon eredményeket, melyek a kutatási támogatás segítségével születtek. Továbbá két összefoglaló közlemény is született (ebből egy még 'under review' állapotban van). Legszorosabban a kutatási témához tartozó tudományos folyóiratcikkek száma 4 (IF: 7,425), további publikációk előkészítése jelenleg is folyamatban van.

A kutatási pályázatban munkánk során négy irányadó megközelítést alkalmaztunk, egyrészt a protein biomarkerek jelenlétének, szerepének tanulmányozására, másrészt a traumás agysérüléssel történő összefüggések keresésére: I.) humán szervezetben előforduló (endogén) biomarkerek mérésének, illetve II.) állatkísérletes koponyatrauma modellek tanulmányozásának segítségével. Az egyes kísérletek kivitelezése során lehetőség szerint minél több oldalról ('endpoint') próbáltuk megközelíteni, illetve alátámasztani a kísérleti koncepciót és eredményeket. III.) A pályázatban kitűzött célok mellett számos más, a pályázatban megfogalmazott célokhoz kapcsolódó témában is értünk el sikeres eredményeket a támogatás segítségével. IV.) Törekedtünk továbbá olyan összefoglaló közlemények megjelentetésére, melyek hűen tükrözik jelen témában a tudomány akkori és jelenlegi állását – saját és társkutatók munkáit alapul véve.

I. HUMÁN VIZSGÁLATOK

A PTE KK Idegsebészeti Klinikán kezelt súlyos koponyasérültektől (TBI) agygerincvelői folyadék (liquor) és szérum minták gyűjtését kezdtük el a pályázat kezdetétől fogva, és azóta is folyamatosan végezzük: egy-egy sérült esetében az esetleges elhalálozásig, de maximum 10 napon keresztül, napi kétszer (12:00 és 24:00). Jelenlegi mintaszámunk az elmúlt időszak gyűjtéséből 2072 db. A -80 °C-on tárolt mintákból többféle – főként biomarkerek kimutatására – korábban tervezett kísérlet folyik, illetve némelyek előkészítése folyamatban van.

Az emberi szervezet bizonyos testnedveiben korábban kimutattuk az endogén módon jelen lévő „pituitary adenylate cyclase activating polypeptide”-et (PACAP). Később ezen eredményeket összegeztük többek között a *Neuropeptides* 2010 konferencián (LAMMEL et al., 2010) és *Acta Physiologica* 2011-es Kongresszusán (REGLODI et al., 2011). Ebből kifolyólag munkánk egyik fő csapásirányának az endogén PACAP szerepének, hatásának, jelenlétének részletesebb vizsgálata kínálkozott a folyamatosan gyűjtött minták segítségével. Továbbá a korábbi rendkívül eredményes együttműködések szerves folytatásaként, illetve a Klinikánkon rendelkezésre álló anyagi és tárgyi feltételekben mutatkozó hiányosságok miatt, más intézetekkel (Anatómiai Intézet, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet (FFI)) is kooperáltunk.

Az irányításom alatt gyűjtött humán liquor és plazma minták endogén PACAP koncentrációjának, illetve annak a klinikai kimenetellel kapcsolatos összefüggéseit vizsgáltuk és jelenleg is vizsgáljuk a PTE KK FFI-ében, tekintve, hogy annak neuroprotektív hatását számos közlemény igazolja állatkísérletes koponyatrauma-modelleken. Ennek ellenére embereknél nem ismert esetleges koncentrációváltozása és annak kinetikája, élettani hatása központi idegrendszeri sérülést követően. Szoros együttműködésben adaptáltuk és beállítottuk az FFI-ben már endogén PACAP kimutatására egyéb mintákon és célokkal sikerrel alkalmazott Radio Immuno Assay (RIA) módszert a súlyos koponyasérültjeinktől gyűjtött liquor- és plazma-minták PACAP tartalmának detektálására és kvantifikálására. Mivel a pilot

kísérletek eredményei (10 beteg mintáin) megerősítették azon feltevésünket, hogy az endogén PACAP mint lehetséges biomarker jelen van a humán szérum és liquor mintákban, illetve koncentrációjának időbeni változása többféle jellegzetes mintázatot mutat, ezért folytattuk a különböző mintázatok lehetséges hátterének feltárását, mind a sérülés patomechanizmusának, mind a klinikai diagnosztikai és terápiás beavatkozások lehetséges hatásának elemzése alapján – adekvát statisztikai módszerekkel alátámasztva. Elvégeztük a fő kísérletsorozat első fázisát, melynek eredményeiről a *National Neurotrauma Society* Las Vegasban tartott Symposiumán 2010-ben számoltam be (BUKOVICS et al., 2010) – legjobb tudomásunk szerint a világon először humán TBI – endogén PACAP vonatkozásában. Esetszámot növelve 20 beteg mintáinak analizálása és elemzése során is megerősítést nyert az endogén PACAP detektálhatósága humán plazmában és liquorban. Az esetek többségében koncentrációja mindkét mintatípusban jelentősen emelkedett a súlyos koponyasérülést követő 24-48 órában. Legtöbb esetben a PACAP szintjének változása a plazma és liquor mintákban parallelnek bizonyult. Ez utóbbi megfigyelés is alátámasztja – a súlyos koponyasérültek többségénél – a vér-agy gát jelentős sérülését. Mindezeket túl szignifikáns negatív korreláció volt megfigyelhető a PACAP átlagos és legmagasabb plazma szintjei és az első tíz napban bekövetkező mortalitás között. Ezen eredmények mind alátámasztják az endogén PACAP hipotetikus neuroprotektív hatását a súlyos koponyasérülés akut fázisában. Ezen (későbbi) eredmények bemutatása 2011 decemberében történt a „10th International Symposium on VIP-PACAP and Related Peptides” konferencián Izraelben, melyen elnyertem az „*Arimura Young Investigator Award*” díjat.

További betegek bevonásával (jelenleg összesen 39 alany), illetve további statisztikai módszerek (pl. egyváltozós logisztikus regresszió) felhasználásával folytattuk kísérleteinket, melynek kiértékelése részben megtörtént. Kontroll – meningitis és más neurológiai elváltozások gyanúja miatti lumbal punctióból származó, és negatívnak diagnosztizált – liquormintákban, illetve egészséges önkéntesek plazmamintáiban mért PACAP koncentrációkkal összevetve a koponyasérültek mintáiban található PACAP értékek (mind az első, a második napi, a legmagasabb és az átlagos plazma/liquor értékek vonatkozásában) szignifikánsan magasabbnak bizonyultak (ANOVA; $p < 0,05$). A megnövelt esetszám mellett logisztikus regresszióval sikerült szignifikáns védő faktorként ($OR < 1,00$; $p < 0,05$) azonosítani a PACAP plazmában mért szintjét (második napi érték; összes mért érték átlaga) az egy hetes (a leginkább a koponyasérülés illetve annak akut szövődményei következtében bekövetkező) mortalitásra vonatkozólag. Ismertetett eredményinket idén tervezzük publikálni – a beadandó cikk pillanatnyilag kézirat stádiumban létezik (BUKOVICS et al., 2012).

Terveink között szerepel a fenti összefüggések verifikálása különböző állatkísérletes modellekben.

II. ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATOK

Ismeretes, hogy hazánkban a baleseti agysérülés vezető haláloknak számít a 40 év alattiak körében – 55% mortalitással. Jelen vizsgálatunkban a primer agysérülésen belül – a legtöbb hosszan tartó comatosus állapothoz vezető, a halálozás jelentős részének okaként azonosítható – diffúz axonális károsodás tanulmányozását, kezelésének lehetséges módszereit tekintettük elsődleges célunknak állatkísérletes modellek és különböző, potenciálisan neuroprotektívnek vélt szerek alkalmazásával.

A traumás agysérülés mechanizmusával foglalkozó korábbi munkánk (CZEITER et al., 2008) során bizonyítást nyert, hogy az axonkárosodás mértéke pozitívan korrelál a trauma nagyságával. Ezen eredményeket alapul véve vizsgáltuk egy diffúz traumás axonsérüléses állatkísérletes modellen (Marmarou modell, Wistar patkányokon) a kalcium indukálta, calpain mediálta proteolízis folyamatát MDL-28170 nevű calpain inhibítort és tormagyökéroxidázt (HRP) mint jelölő anyagot felhasználva, melynek eredményeiről részletesen

beszámoltunk közleményünkben (CZEITER et al., 2010). Célunk az MDL-28170 axonoprotektív hatásának igazolása volt. Kísérletsorozatunk során immunhisztokémiai módszerrel igazoltuk, hogy a sérülés előtt injektált vegyület szignifikánsan csökkentette a HRP-jelölt axonszakaszok átlagos hosszát a tractus corticospinalisban, alátámasztva az MDL-28170 axonoprotektív hatását.

Centrális folyadékperkussziós modell segítségével vizsgálatokat folytattunk annak kiderítésére, hogy a (exogén) PACAP intracerebroventrikuláris (icv.) beadása milyen hatással van a diffúz axonkárosodás mértékére. Neuroprotekción szempontjából a PACAP versus vivőanyag kezelt állatok axonális sérülése között szignifikáns különbség mutatkozott a tractus corticospinalisban (KOVESDI et al., 2008). Többek között ezen kutatási eredmények adták az ötletet a korábban említett humán TBI betegek mintáinak endogén PACAP vizsgálataira.

Megvizsgáltuk továbbá egy új poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor (L-2286) neuro/axono-protektív potenciálját is, szintén állatkísérletes (impakt akcelerációs) koponyatrauma modellben. Neuroprotektív hatást egyrészt immunhisztokémiai módszerekkel, másrészt funkcionális, magatartásvizsgálati tesztekkel (beam-balance, open-field és emelt keresztpalló modell) igazoltuk. Eredményeinkből kiderül, hogy a vizsgált összes időpontban icv. alkalmazott 100 microgramm/patkány dózis szignifikánsan csökkentette a károsodott axonok sűrűségét mind a tractus corticospinalisban, mind pedig a fasciculus longitudinalis medialisban – összehasonlítva a kontroll állatok eredményeivel. Magatartásvizsgálataink minden kezelési protokollnál rámutattak az állatok szorongásának csökkenésére, míg a motoros funkciók a 30 perces post-injury kezelésben javultak jelentős mértékben (KOVESDI et al., 2010).

Közismert, hogy a traumás agysérülés kimenetele nők esetében kedvezőbb, melyet a szervezetükben magasabb koncentrációban jelen lévő női nemi hormonok idegsejtvédő-regeneráló jellemzőjének tulajdonítanak (*ED Hall et al. (2000): Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. Neurotrauma 17(5): 367-388*). Ez irányú vizsgálatok, illetve tesztelési lehetőség reményében hosszú távú kooperációs kapcsolatot építettem ki Dr. Prókai László és Dr. Tátrai-Prókai Katalin amerikai kutató vegyész professzorokkal, akik kifejlesztettek egy ösztrogén analóg hidrofób vegyületet (DeHidroxi-EstraDiol – DHED) az ösztrogén női nemi hormon egyik összetevőjéből, a 17- β -ösztradiolból (E2) a vegyület kémiai módosításával. A DHED jelentőségét az a tény adja, hogy a vér-agy gáton áthaladva kizárólag a központi idegrendszerben alakul át egy reduktáz enzimrendszer segítségével 17-beta ösztradiollá, ezáltal célirányosan lokálisan fejte ki neuroprotektív hatását – elkerülve az egyéb nemkívánatos szomatikus (pl. feminizáló) hatásokat. Az anyagnak neuroprotektív hatását már igazolták ischémiás modellben, azonban a Klinikánkon rendelkezésre álló koponyatrauma-modellekkel („impact acceleration head injury modell” és „fluid percussion head injury modell”) még nem történtek vizsgálatok. A „material transfer agreement” aláírása és az anyagátadást követően az új vegyület vizsgálatához szükséges állatkísérleteket előkészítettük, megterveztük az előkísérleteket, melyeket 2009 szeptember közepén-végén egy egyetemi tanársegéddel, két PhD hallgatóval, két TDK hallgatóval és egy technikus kollégával kezdtünk el. Céljaink között szerepelt a DHED neuroprotektív hatásának bizonyítása az említett modelleken, megvizsgálni a sérülés előtti, illetve utáni DHED/E2 kezelések közötti különbséget, végül feltérképezni a várt neuroprotektív hatás összefüggését a beadott dózissal.

1 órás pre- és ½ órás posttraumás modellekben (impakt akcelerációs középsúlyos trauma, mely diffúzan elszórt axon sérüléseket okoz a hosszúpályák agytörzsi szakaszán) igazoltuk, hogy a DHED szignifikánsan csökkentette a sérült axonprofilok számát a háromféle kontrollcsoporthoz [E2-kezelt; vivőanyaggal (kukoricaolaj = vehiculum) kezelt; illetve kezeletlen, azaz csak traumát kapott csoportok] képest. Mind az alkalmazott leghatásosabb dózist (100 μ g/kg – dózis-hatás görbe alapján), mind a traumához képest a

kezelés időpontját, mind az alkalmazandó trauma nagyságát sikerült megállapítani. Két órást túlélést és intraperitoneális túlaltatást követően transzkardiális perfúziót alkalmaztunk fizioiógias sóoldattal majd 4%-os formalin-PBS pufferrel. A további 24 órát követő agykivétel után történt az immunhisztokémiai feldolgozás.

Kísérleteink későbbi fázisában a szakirodalomban preferált folyadékperkusziós modellel és az állatszám növelésével folytattuk munkánkat – kiegészítve a korábbi cikkeinkben már leírt funkcionális (magatartás) modellel a kognitív és motoros funkciók vizsgálatára, és az agyi kontúzió igazolására 3T MRI alkalmazásával.

Eredményeinket TDK hallgatóm tudományos konferenciákon, előadások formájában ismertette: „Az ösztrogén és az ösztrogén analóg DHED neuroprotektív hatásának vizsgálata”:

- Kari Tudományos Diákköri Konferencia, PTE Általános Orvostudományi Kar, Pécs, 2011. február 24;
- IX. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, PTE Grastyán Endre Szakkollégium, Pécs, 2011. március 29 - április 1;
- XXX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Orvos- és Egészségtudományi Szekció, Debrecen, 2011. április 8;
- XVI. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2011. április 14-15;
- 18th Student Scientific Conference Targu Mures, Marosvásárhely Románia, 2011. március 17-20.

A PTE ÁOK Kari Tudományos Diákköri Konferenciáján eredményeink bemutatásával első helyezést ért el.

Tekintve, hogy a fent ismertetett DHED nevű kísérleti szer kifejlesztői által még nem került kellő mértékben hivatalos publikálásra, szabadalmi okokból egyelőre eredményeink tudományos folyóiratban történő közlésére nem kaptunk engedélyt. Reményeink szerint eredményeink publikálására 2012 folyamán – kifejlesztő vegyész kollégákkal történő egyeztetés után – kerülhet sor.

A neuropathológiai kutatólaboratóriumban rutinszerűen végezhetőek bizonyos biomarker vizsgálatok: beállítottuk a módszereket spektrin lebontási termékek és az S-100-as fehérje kimutatására – előbbi Western-blot, utóbbit ELISA technikával, azonban a tesztelési, illetve kísérleti szakaszon túl az ezirányú kutatásainkat anyagi forrás / keret hiányában tárgyidőszak alatt nem folytathattuk.

III. KUTATÁSI TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB MUNKÁLATOK

Kísérleteket végeztünk azon feltevés további tudományos bizonyítására, hogy a traumás agysérülés a sérülés helyétől távolabbi régiókban is kivált axonkárosodást, beleértve a gerincvelőt is. Állatkísérletes modellel bebizonyítottuk, hogy a traumás axonkárosodás mértéke pozitív korrelációt mutat a sérülés nagyságával és negatív korrelációt a sérülés helyétől való távolsággal (CZEITER et al., 2008).

A koponyasérülés során létrejövő pathológiás folyamatok megértéséhez elengedhetetlen azok fizikai-kémiai hátterének vizsgálata szövettani és transzmissziós elektron-mikroszkópos módszerekkel. Ehhez kapcsolódik két megjelent közlemény (BUKOVICS et al., 2008; GALLYAS et al., 2009). Állatkísérletek során megcáfoltuk azt a – bizonyos tudományos körökben – évtizedek óta elfogadott tényt, hogy a koponyasérülés során keletkezett ún. „sötét-sejteket” az aldehides fixáló okozza. Továbbá igazoltuk, hogy ezen „sötét-sejtek” kialakulása az intracelluláris gélrendszer fázisátalakulása következtében megy végbe – megelőzve és kiváltva a későbbi enzimátikus folyamatokat.

Pathológiás mechanizmusok élő szervezetben végbemenő *in vivo* vizsgálatához, illetve a pályázat biomarker vizsgálatának további alátámasztásához (külön „endpoint” gyanánt) MRI kísérleteket is végeztünk. Kezdetben kvantitatív MR állatkísérletekben (patkányagy) vizsgáltuk a Pécsi Diagnosztikai Központban található klinikai 3T humán szkennerek képességeit longitudinális (T1) és transzverzális (T2) relaxációs időt alkalmazva, illetve a diffúzió-súlyozott képalkotó eljárást (mind mono-, mind biexponenciális megközelítéssel). Tanulmány során ezen protokollok mellett mikroszkópos felbontást, illetve belső víztartalom referenciával kvantitatív proton spektroszkópiát is vizsgáltunk. A kísérlet eredményeinek konklúziója, hogy nagy térerejű klinikai szkennerek alkalmazásával kvantitatív képalkotás és spektroszkópia is kivitelezhető kisállatokon (ARADI et al., 2010), ezáltal bebizonyosodott, hogy hatékonyan végezhetőek ezen körülmények között további – célirányos – MR kísérletek.

További MRI-vel összefüggő vizsgálataink során diffúzió súlyozott képalkotó módszer biexponenciális elemzésével *in vivo* tanulmányoztuk az intracelluláris agyödémát, illetve tranzmissziós elektronmikroszkópiával (mint morfológiai háttér) támasztottuk alá az MR-nél tapasztalt megfigyeléseket. Intraperitoneális dextróz oldatot alkalmazva váltottuk ki felnőtt Wistar patkányoknál az agyödémát, és agyi víztartalom méréséhez MR spektroszkópiát is alkalmaztunk (STEIER et al., 2011). Célunk annak bizonyítása volt, hogy az agyi intracelluláris vízterekkel összefüggésben lévő ún. „látszólagos diffúziós koefficiens” (ADC) milyen mértékben hozható kapcsolatba egy esetleges stroke során fellépő agyi ödémával.

IV. ÖSSZEFOGLALÓ KÖZLEMÉNYEK, KUTATÁSI TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TANULMÁNY

Összegyűjtve a 2009-ig megjelent – protein biomarker – témával kapcsolatban fontosabbnak ítélt tudományos publikációkat, összefoglaló közleményt jelentettünk meg a protein biomarkerek szerepéről – kihangsúlyozva jelentőségüket a klinikai gyakorlatban (KÖVESDI et al., 2009), illetve elbírálás alatt van a *Journal of Molecular Neuroscience* szakfolyóiratnál egy review közlemény, mely a PACAP központi és perifériás idegrendszeri sérülésekre gyakorolt hatását mutatja be. Utóbbi publikációval célunk, hogy az eddig megjelent közlemények segítségével összegezve bemutassuk a PACAP neuroprotektív potenciálját különböző traumás idegsérülési modelleknél (TAMÁS et al., 2012).

A biomarkerek koponyatraumás agysérülésnél játszott potenciális diagnosztikus és prognosztikus szerepével kapcsolatosan a Department of Defense (US) támogatású multicentrikus klinikai tanulmány kivitelezésében veszünk részt (Szponzor: BANYAN Biomarkers Inc.).

Tekintve, hogy a fent leírtak alapján a projekt némely – jelentős – eredményének közzétételére még nem volt lehetőség, a publikálást később, de maximum 2 éven belül tervezem, kérni szeretném Tisztelt Zsűrit és Tisztelt Bírálókat, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.

Pécs, 2012. január 26.



Dr. Bukovics Péter
tudományos munkatárs