

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az atherosclerosis súlyosságának és klinikopatológiai
jellegzetességeinek vizsgálata stroke betegeken**

Dr. Molnár Sándor



**Debreceni Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2010**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
1. BEVEZETÉS, CÉLKITÚZÉSEK	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
<i>2.1. Az IMT, a Chlamydia infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata</i>	6
2.1.1. Az intima-media vastagság (IMT) jelentősége, vizsgálata	6
2.1.2. A Chlamydia pneumoniae szerepe az atherosclerosisban	7
<i>2.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata</i>	8
<i>2.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása</i>	9
3. BETEGCSOPORTOK, VIZSGÁLATI MINTÁK, MÓDSZEREK	11
<i>3.1. Betegcsoportok, vizsgálati minták</i>	11
3.1.1. Az IMT, a Chlamydia infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata	11
3.1.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata	12
3.1.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása	12
<i>3.2. Módszerek</i>	13
3.2.1. Intima-media vastagság (IMT) mérése	13
3.2.2. Chlamydia pneumoniae ellenes antitestek vizsgálata	14
3.2.3. Chlamydia pneumoniae DNS kimutatása a carotis plakkokban PCR-al	14
3.2.4. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata PIXE módszerrel	14
3.2.5. Az eltávolított erek atherosclerosisának post mortem vizsgálata	17
<i>3.3. Statisztikai elemzés</i>	19
4. EREDMÉNYEK	20
<i>4.1. Az IMT, a Chlamydia infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata</i>	20
<i>4.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata</i>	22
<i>4.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása</i>	26
5. MEGBESZÉLÉS	30
<i>5.1. Az IMT, a Chlamydia infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata</i>	30
<i>5.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata</i>	32
<i>5.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása</i>	34
6. ÖSSZEFOGLALÁS	38
6. SUMMARY	39
7. IRODALOM	40
8. TÁRGYSZAVAK	55
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
10. FÜGGELÉK	57

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACC:	arteria carotis communis
ACD:	arteria coronaria dextra
ACE:	arteria carotis externa
ACI:	arteria carotis interna
ACM:	arteria cerebri media
AFF:	arteria femoralis főtrzs
AFS:	arteria femoralis superficialis
ANOVA:	analysis of variance (variancia-analízis)
APF:	arteria profunda femoris
ASO:	atherosclerosis obliterans
Ca:	kalcium
CRP:	C-reaktív protein
CT:	computer tomography (számítógépes rétegvizsgálat)
DM:	diabetes mellitus
DNS:	dezoxiribo-nukleinsav
EDTA:	etilén-diamin-tetra-acetát
ELISA:	enzyme linked immunsorbent assay
HT:	hypertonia
IgA:	immunglobulin A
IgG:	immunglobulin G
IMT:	intima-media thickness (intima-media vastagság)
ISZB:	ischaemiás szívbetegség
MeV:	megaelektronvolt
MR:	mágneses rezonancia vizsgálat
MV:	megavolt
OD:	optikai denzitás
OMP:	outer membrane protein (külső membránprotein)
PCR:	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PIXE:	particle induced X-ray emission (részecske indukált röntgenemisszió)
RIA:	ramus interventricularis anterior arteriae coronariae sinistrae
SD:	standard deviáció
Si(Li):	lítiummal szennyezett szilícium detektor
STIM:	scanning transmission ion-microscopy (pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia)
TNE:	TRIS-Nátrium-klorid-EDTA puffer
TOAST:	„Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment” vizsgálat
TRIS:	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid
UH:	ultrahang

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az agyi érbetegség a fejlett országokban a halálhoz és tartós rokkantsághoz vezető leggyakoribb betegségek egyike (Bonita és mtsai 1990, 1992). 2001-es nemzetközi és magyar adatok alapján az ischaemiás stroke 30 napon belüli halálozása 13-15%. 2003-as WHO statisztikák szerint Magyarországon a cardiovascularis és cerebrovascularis betegségek halálozása az európai átlag 2-2,5 szerese (Nagy 2006). A fejlett nyugat-európai országokhoz képest Magyarországon a 65 év alattiak cerebrovascularis ok miatti halálozásának valószínűsége 3-4 -szeres, míg a 35-44 éves korosztályban akár 5-9 -szeres is lehet (Nagy 2006). A coronariabetegekkel ellentétben - akiknek 70-80%-a képes a korábbi munkáját végezni - a stroke-ot túlélők 10-20%-a élete végéig teljes ellátásra, 30-40%-uk mindennapi életvitelében segítségre szorul.

A kialakult stroke specifikus kezelése az egyre szaporodó lehetőségeink ellenére csak a betegek egy részénél lehetséges és csak a kezelték egy részénél eredményes (Adams és mtsai 2007, ESO 2008). A primer és szekunder vascularis prevenció célja a stroke, a szívinfarktus, valamint az egyéb érszűkület miatti események és halálozás megelőzése a rizikófaktorok felismerése és megfelelő kezelése révén. A rizikóbecslésre ezért egyre fontosabb szerep hárul a stroke és egyéb vascularis prevencióban.

A stroke legfontosabb befolyásolható rizikófaktorai a hypertonia, hyperlipidaemia, diabetes mellitus, az arteria carotisok stenosisa, és a dohányzás, melyek az atherosclerosis folyamatán keresztül vezetnek az agyi érkatasztrófához (Goldstein és mtsai 2006). Az atherosclerosis folyamata generalizált, megjelenési formája, eloszlása az érrendszeren belül egyénenként változik. Az ischaemiás események prognózisa rosszabb azon betegekben, akiknek több érterületében is szignifikáns atheroscleroticus elváltozások találhatók (Cirillo és mtsai 2001, Espinola-Klein és mtsai 2002). Az egyes érterületekben mutatkozó atheroscleroticus folyamatok közötti szoros összefüggéseket számos vizsgálat eredményei bizonyítják (Lekakis és mtsai 2000 és 2005, Cerne és mtsai 2002, Lanzer és mtsai 2003).

Az arteria carotis communisban ultrahanggal mért intima-media vastagságot (IMT) számos tanulmány eredménye alapján az atherosclerosis korai markerének tekintik (Zureik és mtsai 2000, Bots és Grobbee 2002, Páll és mtsai 2003).

Tekintettel arra, hogy az atherosclerosis generalizált folyamat, a társszaktmák mind szorosabb együttműködésére van szükség az érbetegek kezelésében és gondozásában. A

szakmaspecifikus gondolkodásmód egységes (kardio- cerebrovascularis és perifériás érbetegség) szemléletté formálódása figyelhető meg napjainkban.

Az újabb kutatások az atherosclerosis folyamatában a gyulladás jelentőségét hangsúlyozzák (Kiechl és mtsai 2001, Gromadzka és mtsai 2001, Magyar 2003, Nencini és mtsai 2003). A krónikus fertőzések közül a periodontitist, a fertőző ágensek között szeroepidemiológiai vizsgálatok alapján a *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* és a Cytomegalovirust hozták összefüggésbe az atherosclerosis-sal (Danesh és mtsai 1997). A három kórokozó közül *Chlamydia pneumoniae* kiemelt fontosságú. Állatkísérletek alapján feltételezhető az atherogen hatása. Klinikai prospektív vizsgálatban makrolid antibiotikum kezelés csökkentette az újabb cardiovascularis események valószínűségét myocardialis infarctuson átesett, chlamydia szeropozitív betegekben (Gupta és mtsai 1997). Populációs prospektív vizsgálatban bizonyították a kórokozó elleni IgA szeropozitivitás független kapcsolatát a carotis és femoralis atherosclerosis jelenlétével (Mayr és mtsai 2000).

Célkitűzések:

1. Később fatális kimenetelű stroke miatt kezelt idős betegekben *in vivo* a cardiovascularis rizikófaktorokat, a carotis communis intima-media vastagságot (IMT) és a *Chlamydia pneumoniae* szerológiát vizsgáltuk. Haláluk után az eltávolított carotisok plakkjaiban polimeráz láncreakcióval (PCR) kerestük a *Chlamydia pneumoniae* DNS jelenlétét és az arteria carotisok falvastagságát határoztuk meg.
 - a. Az arteria carotis communis IMT (mint atherosclerosis marker) és az atherosclerosis rizikófaktorai - elsősorban a *Chlamydia pneumoniae* infekció szerológiai markerei - közötti összefüggéseket vizsgáltuk. Van-e szerepe a *Chlamydia pneumoniae* infekciónak az atherosclerosis folyamatában?
 - b. Az arteria carotis communisban *in vivo* mért IMT és az arteria carotis ágakban *post mortem* észlelt atheroscleroticus elváltozások közötti összefüggéseket vizsgálva arra kerestük a választ, mennyire jellemzi az IMT a carotisok atherosclerosisának súlyosságát.

- c. Az eltávolított arteria carotis internák plakkjaiban a *Chlamydia pneumoniae* DNS jelenlétét kerestük, melyet az *in vivo* nyert szerológiai adatokkal, arteria carotis communis IMT-vel, továbbá a *post mortem* mért átlagos falvastagsággal korreláltatva a *Chlamydia pneumoniae* atherosclerosisban betöltött szerepét vizsgáltuk.
2. Az arteria carotis communisban *in vivo* mértük az IMT-t, majd összevetettük a *post mortem* ugyanazon érszakaszokból készített keresztmetszeti szeletekben a részecske indukált röntgensugár emisszió (PIXE) módszerrel mért érfali kalcium tartalommal. Arra kerestük a választ, hogy a non invazív vizsgálattal mért IMT mennyire jelzi atherosclerosis korai stádiumában kialakuló érfali kalcifikációt. A PIXE módszerrel készült képeken az érfalon belüli kalcifikáció lokalizációját vizsgáltuk, melyik érfali rétegben jelentkezik legintenzívebben a kalcium lerakódás.
3. Az arteria carotisokban, a coronariákban és az arteria femoralisokban észlelhető atheroscleroticus elváltozások súlyosságát és eloszlását hasonlítottuk össze *post mortem*, kvantitativ patológiai módszerekkel stroke-ban elhunyt betegekben. Vizsgáltuk, hogy az egyes érterületek atherosclerosisának súlyossága mennyire jellemzi a többi terület elváltozásait, a generalizált atherosclerosis jól vizsgálható, megbízható marker artériáját keresve a klinikum számára.

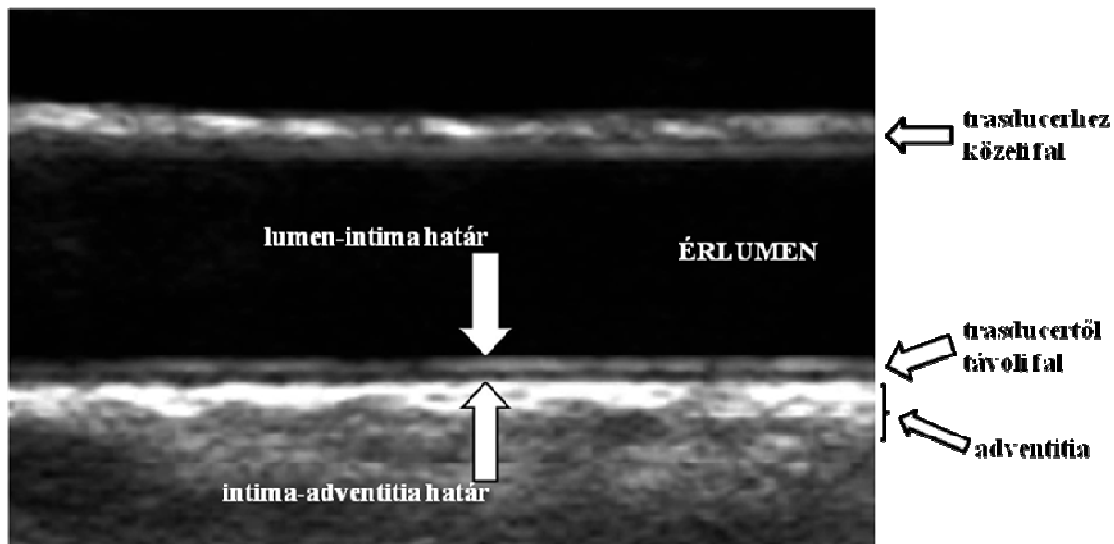
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az IMT, a Chlamydia infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata

2.1.1. Az intima-media vastagság (IMT) jelentősége, vizsgálata

Az arteria carotisok testfelszínhez közeli elhelyezkedésük miatt jól vizsgálhatók ultrahanggal. Mind az atheroscleroticus major érelváltozások (kinking, hypoplasia, plakkok, szűkületek, occlusio), mind a finomabb érfali elváltozások (IMT) vizsgálata részévé vált napjaink klinikai gyakorlatának. A carotis ultrahang vizsgálat elterjedését előnyös tulajdonságai segítették. A módszer non-invazív, bármikor ismételhető, nincs ionizáló sugárterhelés, a szűkületek és egyéb patológiás érelváltozások gyakorlott vizsgálóval nagy pontossággal, kvantitativ is meghatározhatók (Widder 1999). Modern, nagy felbontású készülékek B-mode képein az érfal tunica intima és tunica media rétegei kettős vonalként ábrázolhatók (**1. ábra**). Az intima-media vastagságot (IMT) definíció szerint az ultrahang transducertől távolabbi érfalon a lumen és az első echogen vonal (lumen- intima határ) valamint a második echogen réteg (adventitia felső rétege) között mérjük (**1. ábra**) (Touboul és mtsai: Mannheim intima-media thickness consensus, 2004). Az arteria carotis communisban mért IMT-t számos tanulmány eredménye alapján az atherosclerosis korai markerének tekintik (Zureik és mtsai 2000, Bots és Grobbee 2002, Páll és mtsai 2003). A cardiovascularis rizikófaktorokkal is korrelál az IMT (Davis és mtsai 2001). Mások szerint a cardiovascularis és cerebrovascularis események valószínűsége is összefügg az IMT-vel (Bots és mtsai 1997, O'Leary és mtsai 1999, Chambless és mtsai 2000, Simon és mtsai 2002). Prospektív vizsgálatok szerint az emelkedett IMT már fiatal korban is független jelzője a vascularis eseményeknek (Lorenz és mtsai 2006). A magasabb IMT értékek és a recurrens stroke rizikója között is összefüggést találtak (Tsivgoulis és mtsai 2006). A mérési technika standardizálásával az ismételt mérések alkalmasak a korai atheroscleroticus folyamatok és az azt befolyásoló tényezők, gyógyszerek hatásának követésére is (Mercury és mtsai 1996, Magyar és mtsai 2004, Kastelein és mtsai 2005).

Testfelszín, traszducer felé eső oldal



1. ábra Az arteria carotis communis nagyított B-mode ultrahang képen. Az intima-media vastagságon (IMT) a két nyíl közé eső - a lumen-intima határ és az adventitia belső rétegét jelentő második echogen vonal közötti - távolságot értjük.

2.1.2. A *Chlamydia pneumoniae* szerepe az atherosclerosisban

Újabb ismereteink szerint a klasszikus rizikófaktorok mellett a gyulladás is igen fontos szerepet játszik az atherosclerosis folyamatában, különösen a kezdeti intima sérülés, majd intima hyperplasia létrejöttében, később a plakk-destabilizációban (Kiechl és mtsai 2001, Gromadzka és mtsai 2001, Nencini és mtsai 2003, Magyar és mtsai 2003). Az endotheliumot vagy az atheroscleroticus plakkokat infiltráló macrophagokat megfertőzni képes kórokozóról feltételezik, hogy az artériák intima és media rétegeiben beindítják és fokozzák a gyulladásos folyamatokat. (Mayr és mtsai 2000, Espinola-Klein és mtsai 2002).

A *Chlamydia pneumoniae* egy intracellularis baktérium, mely a légutakon át bejutva a keringő macrophagokkal terjed a szervezetben és az endotheliumot, sőt az atheroscleroticus plakkok közelében lévő simaizom-sejteket is képes megfertőzni (Yamashita és mtsai 1998, Airenne és mtsai 1999). A kórokozót az atheroscleroticus plakkokból is kimutatták immunhisztokémiai (Yamashita és mtsai 1998) és polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel (Thomas és mtsai 1999, Apfalter és mtsai 2001, Virok és mtsai 2001). Ellentmondásos adatok találhatók az irodalomban a *Chlamydia pneumoniae* az atheroscleroticus plakkokból történő kimutathatóságát illetően. Carotis endarterectomiából származó mintákból és boncolás során

eltávolított erekből (Maass 1997, Yamashita 1998, Apfalter 2001, Virok 2001), 15-55%-os sikerrel mutatták ki a baktériumot.

2.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata

Az atherosclerosis folyamata évtizedek óta intenzív kutatás tárgya. A kalcifikáció a folyamat egyik legfontosabb tényezője, mely kalcium foszfát lerakódásával jár (Libby 2000, LeGeros 2001). Az atherosclerosis és a mészlerakódás is progredial az életkorral (Tohno és Tohno 1998). A carotisokban az atheroscleroticus plakkok által okozott szűkület súlyossága jól korrelál a stroke rizikóval (Barnett és mtsai 1998, Halliday és mtsai 2004), ennek ellenére a carotisok kalcifikációja és a stroke rizikó között ellentmondó összefüggéseket találtak a különböző vizsgálatokban (Nandalur és mtsai 2005, 2006, Nicolaides és mtsai 2005). Az is ismert, hogy a meszes plakkok lényegesen stabilabb szerkezetűek és kevésbé hajlamosak embolizáció vagy plakk ruptura útján ischaemiás stroke-ot okozni, mint a nem kalcifikált lágy vagy fibrosus plakkok (Nandalur és mtsai 2005, Miralles és mtsai 2006). Az említett vizsgálatokban a meszesedés mértékét az atheroscleroticus plakkokban mérték, míg az atherosclerosis korai stádiumában zajló mészlerakódásról kevés adat áll rendelkezésre. A depozitumok érfalon belüli lokalizációja értípusonként változhat (Tohno és Tohno 1998).

A kalcium tartalom meghatározására *in vivo* elektronsugár CT, valamint MR technikákkal lehetséges (Allison és mtsai 2005, Higgins és mtsai 2005, Nandalur és mtsai 2006). Szöveti mintákban a kalcium koncentráció és lokalizáció meghatározására többféle módszert is leírtak: Raman spektroszkópia, „inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, rövidítve ICP-AES, valamint az általunk használt „particle induced X-ray emission”, vagy PIXE módszer (Tohno és Tohno 1998, Brands és mtsai 2001, Nogueira és mtsai 2005, Watt és mtsai 2006,). Az utóbbi jól alkalmazható biológiai mintákban a makro- és nyomelemek meghatározására (Uzonyi és mtsai 2001) és a precíz kvantitatív mérések mellett a lokalizációt is nagy pontossággal meghatározza.

2.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása

Az atherosclerosis generalizált folyamat, kezdetben szubklinikai elváltozásokat okoz az érrendszerben. A diffúz endothelialis dysfunctiohoz később atheroscleroticus, majd tünetes vagy néma thromboticus, thromboemboliás szövődmények társulhatnak. A folyamat regionális eloszlása a szervezeten belül nagy egyéni variációt mutat. Ezt számos vizsgálat bizonyítja, melyekben különböző módszerekkel vizsgálták az atheroscleroticus elváltozásokat az egyes érterületekben. Több, különböző érterület együttes érintettsége figyelmet érdemlő állapot, mivel az ilyen betegekben a cardiovascularis események valószínűsége jóval nagyobb, mint az egy, izolált érterület betegségében szenvedők esetében (Cirillo és mtsai 2001, Espinola-Klein és mtsai 2002).

Non-invazív vizsgáló módszerekkel könnyen hozzáférhető indikátor ereket sok klinikai vizsgálatban alkalmaznak. Az arteria carotis communis (ACC) atheroscleroticus elváltozásait alkalmasnak tartják a teljes érrendszer atheroscleroticus terheltségének jellemzésére. Az utóbbi években igen népszerű módszer az arteria carotis communis IMT mérése. Ennek bevezetése előtt az arteria carotisok atherosclerosisának mértékét az erekben mért szűkület súlyosságával jellemezték (angiográfiás, MR-angiográfiás és ultrahang vizsgálatokkal). Az artériák szűkületének mértéke azonban csak az érbetegség késői stádiumáról informál. A mért IMT értékek anatómiai, hisztológiai, patológiai értelmezése, validálása számos problémát vetett fel (Kanters és mtsai 1997, Schulte-Altdorneburg és mtsai 2001). Az arteria carotis communis IMT-t a coronaria és a femoralis artériák stenosisának súlyosságával és a cardiovascularis események kimenetelével hozták összefüggésbe (Salonen és Salonen 1991, 1993, Bots és mtsai 1994, Adams és mtsai 1995, ARIC study group 1995, Hulthe és mtsai 1997). Egy vizsgálatban az alsóvégtagi perifériás érbetegség jelenléte a vascularis multimorbiditás markerének bizonyult (Criqui és mtsai 1992).

A különböző érterületek atheroscleroticus érintettségének súlyosságát több vizsgálatban, többféle módszerrel is vizsgálták, ezek eredményei azonban ellentmondásosak. Két vizsgálatban csak gyenge korrelációt találtak az arteria carotis vagy femoralis IMT és a coronaria betegség súlyossága között (Adams és mtsai 1995, Cerne és Krajnc 2002). Lekakis és mtsai (2000) azt találták, hogy az arteria femoralisban mért IMT biztosabban jelzi a coronaria betegséget, mint akár az arteria carotis communisban, akár a carotis bulbusban mért IMT. Hulthe és mtsai (1997) szignifikáns korrelációt találtak a carotis bulbusban mért IMT és a coronaria betegség között, azonban sem az arteria carotis communis- IMT, sem az

arteria femoralis- IMT nem korrelált a vizsgált coronaria szakaszok stenosisával. Különböző, coronaria betegeken végzett vizsgálatokban az arteria femoralisok atheroscleroticus elváltozásai szorosabban korreláltak a coronaria betegséggel, mint a carotisokban talált elváltozások (Khoury és mtsai 1997, Pasierski és mtsai 2004).

A több esetben ellentmondó irodalmi adatok értelmezését tovább nehezíti, hogy az IMT és az artériákban található plakkok, azok száma, vagy összterülete alapján számított értékek az atherosclerosis egymástól különböző típusú markerei. Míg az IMT a korai érfali elváltozásokat jellemzi és definíciója szerint plakkmentes érfal szakaszon mérjük, addig a plakkok száma, kiterjedése és az okozott szűkület mértéke már az atherosclerosis egy jóval előrehaladottabb stádiumát írja le.

A fentiekben felsorolt ellentmondásos, nehezen egységesíthető adatok vezették arra munkacsoportunkat, hogy tanulmányozzuk az atherosclerosis súlyosságát a coronaria, a carotis és a femoralis artériákban, klinikai szempontból fontos összefüggéseket keresve. A vizsgálat tervezésekor arra törekedtünk, hogy patológiai módszert válasszunk, mely kiküszöböli az *in vivo* módszerek hátrányait (pl. hangárnyék az ultrahang vizsgálatnál, 2 dimenziós ábrázolás az angiográfiánál) és az atherosclerosis minden stádiumát kvantitatív módon írja le, valamint az az egyes érterületek különböző méretű artériáin talált elváltozások egymással összehasonlíthatók.

3. BETEGCSOPORTOK, VIZSGÁLATI MINTÁK, MÓDSZEREK

3.1. Betegcsoportok, vizsgálati minták

Az értekezés tárgyát képező mindhárom vizsgálatunkba a Debreceni Neurológiai Klinikán súlyos, várhatóan fatális kimenetelű ischaemiás stroke miatt kezelt betegeket válogattuk be. Az életkor alsó határa 50 év volt. A vérzéses stroke-ban szenvedő betegeket a koponya CT vizsgálat alapján kizártuk a tanulmányból. A feltételezhetően ritka okra (pl. thrombophilia) visszavezethető stroke-betegeket kizártuk. Mivel a gyulladásos paraméterek és a *Chlamydia pneumoniae* infekció vizsgálata is a tanulmány részét képezte, ezért a felvételnél, illetve 48 órán belül pneumóniában és egyéb súlyos infekcióban (szepszis) szenvedőket is kizártuk. A vizsgálatokat a DEOEC Klinikai Etikai Bizottsága engedélyezte (1031/2001).

3.1.1. Az IMT, a *Chlamydia* infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata

Összesen 67 stroke-beteget vizsgáltunk (átlagéletkor: 77,2 év; férfi/nő: 27/40). 57 esetben mind az *in vivo* IMT mérést, mind a *Chlamydia* antitest titerek meghatározását elvégeztük, 5 esetben csak az IMT mérés, 2 esetben csak az antitesttiter mérés történt meg, további 3 beteg esetében csak a *post mortem* vizsgálatokat sikerült elvégezni.

A betegek klinikai felvételekor részletes anamnézis felvétel történt, különös tekintettel a vascularis rizikófaktorokra, majd 48 órán belül részletes laboratóriumi vizsgálatokra vért vettünk, melynek része volt a C-reaktív protein (CRP) mérése. A *Chlamydia pneumoniae* ellenes IgA és IgG antitesttiter meghatározáshoz serum mintákat fagyasztottunk -20°C -on.

Hatvankét betegnél elvégeztük a részletes carotis duplex ultrahang vizsgálatot, kétoldali intima-media vastagság (IMT) méréssel az arteria carotis communisokban.

A vizsgált betegek közül 40 elhunyt a stroke és szövődményei következtében. A halálok szerinti megoszlás: 25 esetben pneumónia, 1 bronchiolitis, 3 tüdőembólia, 6 szívélégtelenség, 2 arteria basilaris occlusio, és 7 agytörzsi herniatio volt. Négy esetben két halálok is felmerült, melyek közül az egyik minden esetben pulmonalisnak bizonyult.

Az eltávolított arteria carotisok oszláshoz közeli régiójában található jellegzetes atheroscleroticus plakkokban polimeráz láncreakcióval (PCR) *Chlamydia pneumoniae* specifikus DNS jelenlétét kerestük.

3.1.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata

Három beteg esetében (átlagéletkor: 85,6 év; férfi/nő: 1/2) a kétoldali arteria carotisokon *in vivo* elvégzett és videószalagra rögzített részletes carotis duplex ultrahang vizsgálat és arteria carotis communis IMT mérés után *post mortem* meghatároztuk az érfalak kalcium tartalmát és annak lokalizációját PIXE módszerrel.

3.1.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása

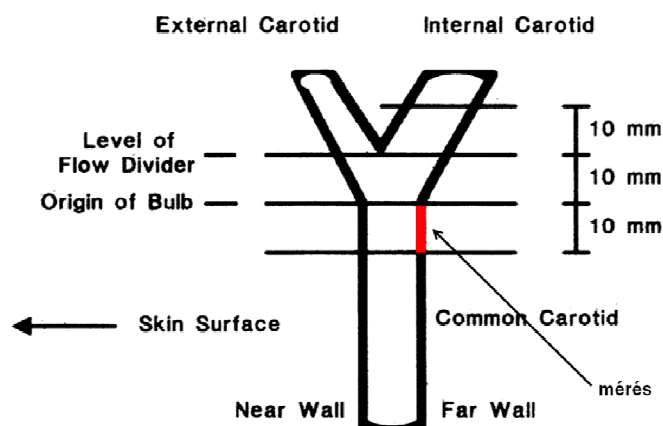
Hatvanhét ischaemiás stroke-os betegből a 3.1.1. pontban részletezett szövödményekben elhunyt 40 beteg (átlagéletkor: 75,3 év; férfi/nő: 21/19) carotis, coronaria és femoralis artériáit vizsgáltuk. A kórházi felvételnél a részletes anamnézis felvétel és a vérminták laboratóriumi vizsgálata történt a függelékben csatolt adatlap szerint a cardiovascularis rizikófaktorok és társbetegségek feltérképezése céljából.

A halált követő boncolás során mindkét oldali arteria carotis communis (ACC) az arteria carotis externa (ACE) és arteria carotis interna (ACI) oszláshoz közeli 2-3 cm-es szakaszával együtt *in toto* eltávolítottuk. A kétoldali arteria femoralist is eltávolítottuk hasonló módon, egy darabban. A ligamentum inguinalétól az arteria profunda femoris (APF) leágazásáig terjedő szakaszt arteria femoralis főtrónusnak (AFF), ennek oszlás alatti folytatását az angol nyelvű elnevezés analógiájára arteria femoralis superficialisnak (AFS) neveztük az egyes szakaszok pontos megkülönböztethetősége céljából. A vizsgált coronaria szakaszok a ramus interventricularis anterior arteriae coronariae sinistrae (RIA) és az arteria coronaria dextra (ACD) főtrónus voltak.

3.2. Módszerek

3.2.1. Intima-media vastagság (IMT) mérése

Az arteria carotisok részletes neurosonológiai vizsgálatát és az IMT mérést a betegek klinikai felvételét követő 48 órán belül SONOS 4500 (Agilent technologies, Andover, MA, USA) készülékkel, 3-11 MHz-es lineáris transducerrel végeztük el. B-mode, color és duplex üzemmódban a carotisokban észlelhető szűkület súlyosságát mértük, majd az egyes érszakaszokban az áramlási sebesség meghatározása után kétszeresére nagyított és kimerevített B-mode képeken standard körülmények között mindkét oldali arteria carotis communisban meghatároztuk az intima-media vastagságot. A méréseket az arteria carotis communisok oszlástól 10 mm-re caudalisan lévő, plakkmentes szakaszán, a transducertől távolabb eső érfalon, end-diastoleban végeztük (Howard és mtsai 1993) (**2. ábra**). Az IMT-t a definíció szerint a képeken látható lumen – intima határfelület első echogen vonala és a második echogen vonal (az adventitia belső rétege) között mértük (**1. ábra**). Minden ér esetében 3-3 mérés történt, a transducer egymással kb. 90 fokos szöget bezáró anterior és lateralis pozíciójában (Kanters és mtsai 1997). A 3 anterior és 3 lateralis transducer pozícióban mért IMT értékek átlagai adták az IMT-anterior és IMT-lateralis értékeket minden arteria carotis communisban. Erenként 6, betegenként 12 IMT értéket kaptunk. Az ultrahang vizsgálatokat videószalagra rögzítettük.



2. ábra Az IMT mérés a nemzetközi ajánlások szerint az arteria carotis communisban a carotis oszlás kezdetétől caudalisan mért 1 cm-es, plakkmentes érszakaszon a transducertől távolabb eső érfalon történt. (Stroke 1993;24:1297-1304).

3.2.2. *Chlamydia pneumoniae* ellenes antitestek vizsgálata

A szerológiai vizsgálatok a klinikai felvételnél levett és lefagyasztott szérumból az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben történtek. A *Chlamydia pneumoniae* külső membrán proteinre (OMP) specifikus IgG és IgA antitesteket ELISA módszerrel mutattuk ki (MEDAC GmbH, Wedel, Germany). A gyártó utasítása szerint a szérumból 50x-es hígítást használtuk. A mintában a vizsgált ellenanyag jelenlétét a „cut-off” 1.1-szeresét meghaladó optikai denzitás (OD) érték, míg a hiányát a „cut-off” 0.9-szeresénél kisebb OD érték jelezte.

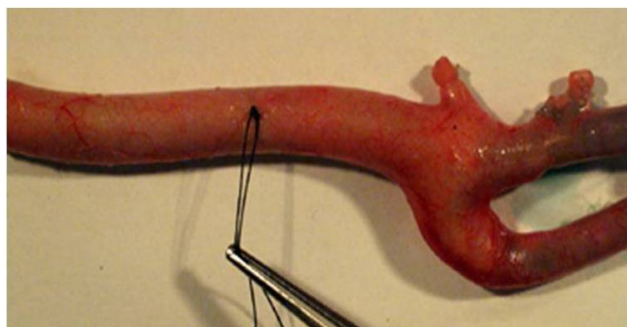
3.2.3. *Chlamydia pneumoniae* DNS kimutatása a carotis plakkokban polimeráz láncreakcióval (PCR)

Az elhunyt betegek carotis osztlában elhelyezkedő típusos atheroscleroticus plakkjaiból származó minták vizsgálata az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben történt. A mintákat apró, 1-2 mm-es darabokra vágtuk, folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztás után mozsárban összetörve 500 µl TNE pufferben (10 mM TRIS-HCl pH 8,0; 100mM NaCl; 1mM EDTA) reszuszpendáltuk, majd 60 µl 10%-os SDS-t (sodium dodecyl sulphate) és 50 µl 10 mg/ml proteináz-K oldatot adtunk hozzá. Alapos összerázás után 3 órán át 55 °C-on emésztettük. A nukleinsavat fenol-kloroform extrakciót követő etanol precipitációval nyertük ki, majd 50 µl TE pufferben (10 mM TRIS-HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA) reszuszpendáltuk. A minták PCR amplifikációra való alkalmasságát béta-globin PCR reakcióval teszteltük. A *Chlamydia pneumoniae* külső membrán proteint (OMP) kódoló szekvenciákat nested PCR technikával sokszoroztattuk. Mind az első, mind a második kör 35 ciklusból állt. A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel vizualizáltuk.

3.2.4. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata részecske indukált röntgenemisszió (PIXE) módszerrel

Az eltávolított arteria carotis communisok IMT mérésben szereplő szakaszait közvetlenül az eltávolítás után sebészi fonállal megjelöltük az ultrahang szondák elhelyezkedésének megfelelő (anterior és lateralis) pontokon, az ultrahang képekkel történő összehasonlíthatóság céljából (3. ábra). A jelölés után az erek ágait lekötve szövettani beágyazó anyaggal

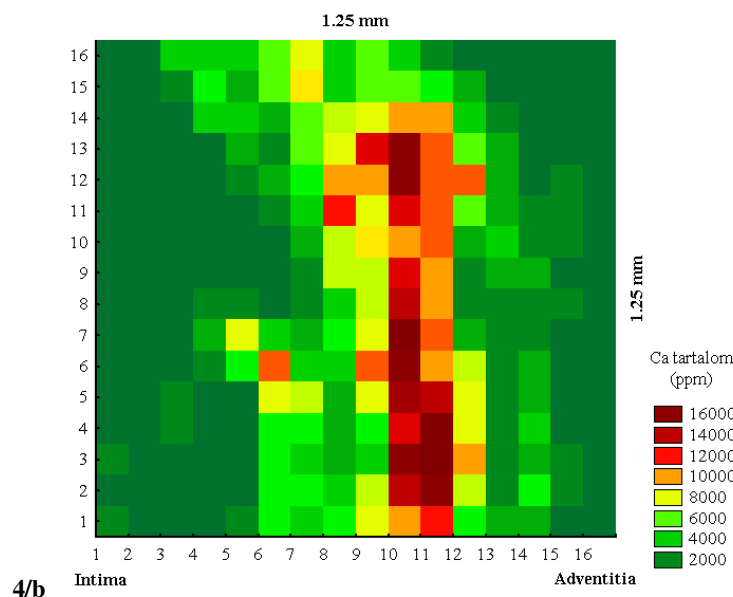
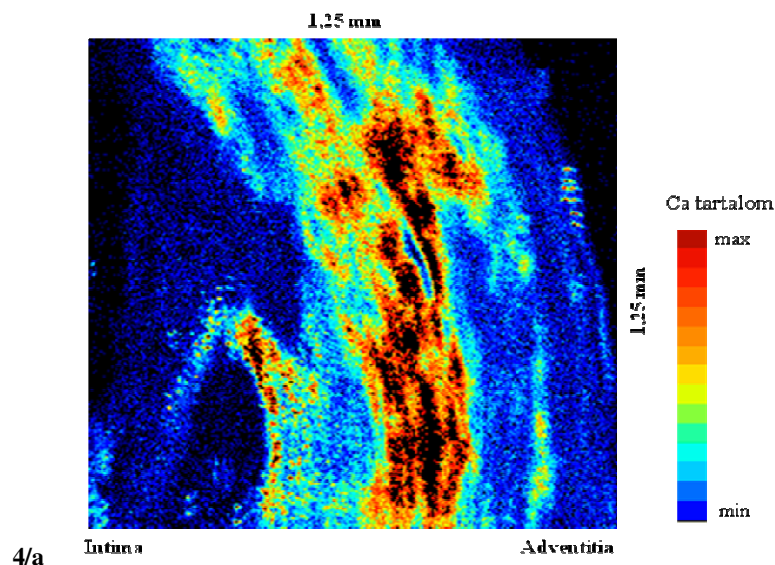
(Cryochrome Blue; Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) töltöttük fel őket, majd $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztva a korábbi IMT mérésben szereplő szakaszokból $60\text{ }\mu\text{m}$ vastag szeleteket készítettünk microtommal. Ezen szeleteket Pioloform membránok közé ágyazva készítettük elő a PIXE mérésekhez, gondosan megjelölve rajtuk az IMT mérés referencia pontjait.



3. ábra Az eltávolított és feltöltött carotis villa. Az IMT mérés szonda-pozícióját az adventitiába öltött sebészi fonállal jelöltük a PIXE méréssel való összehasonlíthatóság végett.

A részecske indukált röntgenemissziós (PIXE) vizsgálatok a Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézetének Ionnyaláb-Alkalmazások Laboratóriumában történtek, az 5 MV-os Van de Graaff gyorsítóhoz csatolt nukleáris mikroszondán (Rajta és mtsai 1996). A mintákban lévő elemek karakterisztikus röntgenvonalainak gerjesztéséhez 2 MeV energiájú és 70-100 pA áramú protonnyalábot használtak. A nyalábot $5 \times 5\text{ }\mu\text{m}^2$ területű foltra fókuszálták és a vizsgált területeket ($1,25 \times 1,25\text{ mm}^2$) végigpásztázták. Minden vizsgált szelet két, egymástól 90° -ra elhelyezkedő részletét vizsgálták, a jelölésekkel szemben, az *in vivo* IMT méréseknek megfelelő érfalpontokon. A PIXE spektrumokat hagyományos berillium ablakos, valamint egy ultravékony ablakos Si (Li) detektorral vették fel. Pásztázó transzmissziós ion-mikroszkópiát (STIM) alkalmaztak a minták energia-elnyelésének meghatározásához, mely a mintán belüli elemek koncentrációjának kiszámításához szükséges. A valós kalcium elemtérképek elkészítése és az abszolút kalcium koncentrációk számítása a PIXEKLM programcsomagon (Szabó és Borbély-Kiss 1993) alapuló True PIXE imaging programmal (Uzonyi és Szabó 2005) történt. A PIXEKLM programcsomag (ezen dolgozat kereteit meghaladó, magasszintű atomfizikai ismereteket igénylő részek leírását mellőzve) a számos mért adat és fizikai jelenség figyelembe vételével az elemkoncentrációk számítását végzi. A PIXEKLM kimenő adatait felhasználva a True PIXE program pixelenként számítja és ábrázolja a tényleges koncentráció értékeket, így készíti el a valós elemtérképeket (**4/a. ábra**). A statisztikai elemzés során az így kapott nagy felbontású kalcium eloszlási térképeket (**4/a. ábra**) 16×16 pixel felbontású egyenlő részekre osztottuk és

minden pixelben meghatároztuk a területére eső kalcium tartalmát (**4/b. ábra**). A vizsgált szakaszokból szövettani metszeteket készítettünk, hematoxinin-eozin festés után fénymikroszkóppal is áttekintettük. A szövettani metszeteket, videószalagról az ultrahangképeket és a PIXE módszerrel készült képeket összehasonlítva győződünk meg a mérési pontok azonosságáról 2 vizsgáló egyetértésével.



4/a-b. ábra

a. Egy arteria carotis communis falrészletének nagy felbontású kalcium eloszlási térképe micro-PIXE módszerrel. A minta mérete $1,25 \times 12,5 \text{ mm}^2$.

b. Ugyanazon érfalrészlet 16x16 pixel felbontásra alakítva a kalcium tartalom pixelenkénti ábrázolásával. A vízszintes tengely az érfalra merőleges, a függőleges tengely az érfallal megközelítően párhuzamos elemtérkép-oldalakat jelöli. A pixeleket 1-16-ig számoztuk.

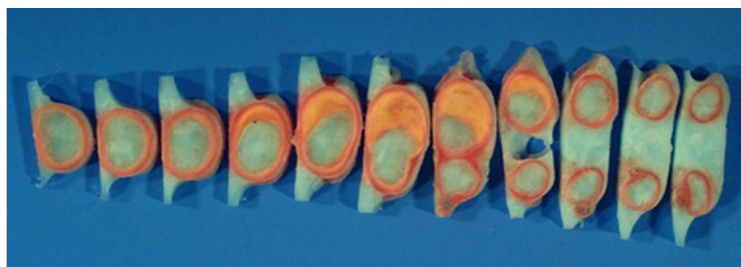
3.2.5. Az eltávolított erek atherosclerosisának *post mortem* vizsgálata

Az eltávolított natív ereket a klinikánkon kidolgozott eljárás szerint (Schulte-Altdorneburg és mtsai 2001) kipreparáltuk, majd a végeket és a kisebb ágakat lekötöttük, nyomás alatt az élőben találhatóhoz hasonló állapotban szövettani beágyazó anyaggal (Cryochrome Blue; Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) légmentesen feltöltöttük, majd $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ –on lefagyasztottuk (**5/a. ábra**). A fagyasztott ereket a beágyazó anyaggal együtt, a bifurcatiotól, mint 0 ponttól mért 3mm vastag szeletekre vágtuk (**5/b. ábra**). Erenként átlagosan 5-8 szeletet sikerült készíteni. A fagyasztott érszeletek vágási felületeit nagy felbontású (3040x2016 pixel), makró optikával (SIGMA 50mm F2.8 EX Macro; Sigma Corporation, Tokyo, Japan) felszerelt professzionális digitális fényképezőgéppel (FinePix S1 Pro; Fuji Photo Film Co. Tokyo, Japan) fotóztuk. Az erek mellé fotózáskor milliméterpapírt helyeztünk a későbbi kalibráláshoz. (**6. ábra**)

5/a.



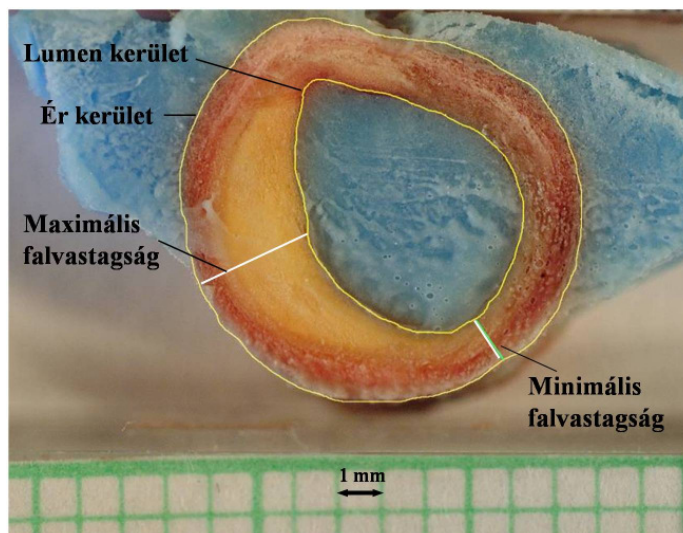
5/b.



5. ábra Kipreparált, lekötött, szövettani beágyazó anyaggal feltöltött és beágyazott arteria carotis villa **a.** fagyasztás előtt, **b.** fagyasztás után, 3 mm vastag szeletekre vágva

A képeket planimetriás terület- és kerület-meghatározásnak vetettük alá, melyhez speciális, tudományos célra kifejlesztett képanalizáló programot alkalmaztunk (Image-J; Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). A mérés során az alábbi paramétereket határoztuk meg: lumenkeresztmetszet (mm^2), érkeresztmetszet (mm^2), lumenkerület (mm), érkerület (mm), maximális falvastagság (mm), minimális falvastagság (mm), illetve további 2 helyen mért falvastagság (egyenlő távolságra a maximális és a minimális falvastagság mérések helyeitől) (**6. ábra**). A méréseket az összes

értékelhető érszeleten elvégeztük. Az elzáródott ereket a mérési adatok értelmezhetetlen volta miatt kizártuk a mérésből. Tekintettel arra, hogy a mérések natív, fagyasztott mintákon történtek és a plakkok határa szövettani festés hiányában a legtöbb esetben nem volt biztonsággal meghatározható, plakk területet nem mértünk.



6. ábra Egy érátmetset a kalibráló milliméter skálával.
Az érszeleteken mért primer paramétereket is ábrázoltuk.

Az érszeleteken mért primer adatokból az alábbi származtatott paramétereket számítottuk:

1. *Átlag falvastagság (mm):* egy érátmetseten belül a 4 falvastagságmérés átlaga
2. *Relatív érfalterület:* (érkeresztmetszet - lumenkeresztmetszet) / érkeresztmetszet
3. *Hosszanti érfal-egyenetlenség:* egy éren belüli maximális falvastagság / egy éren belüli minimális falvastagság
4. *Keresztmetszeti érfal-egyenetlenség:* $\sum_{i=1}^4 |\text{átlag falvastagság} - \text{falvastagság}_i| / 4$
5. *Számított átlag falvastagság (mm):* $\text{érkerület} / 2\pi - \text{lumenkerület} / 2\pi$
6. *Érfal index:* $\text{átlag falvastagság} / (\text{érkerület} / 2\pi)$
7. *Atherosclerosis index:* $\text{relatív érfalterület} * \text{keresztmetszeti érfal-egyenetlenség} * \text{hosszanti érfal-egyenetlenség}$

A paraméterek az atheroscleroticus elváltozások különböző jellegzetességeit jellemzik. Az 1.- 6. paraméterek a lokális érfal elváltozásokat írják le egy érszeleten, illetve egy-egy

érszakasz hosszán belül. Az *Atherosclerosis indexet* olyan paraméterekből származtattuk, melyek mind relatív, mértékegység nélküli értékek, ezáltal kiküszöbölik a méretbeli különbségeket, így biztosítva a különböző lokalizációjú és méretű erek összehasonlíthatóságát.

3.3. Statisztikai elemzés

Az IMT-t, Chlamydia infekciót és carotis atherosclerosist összehasonlító vizsgálatban a két, kategórikus mérés közötti összefüggést kappá teszttel vizsgáltuk. A kategórikus változók folyamatos függő változókra gyakorolt hatását non-parametrikus Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. A folyamatos változók közötti összefüggésekhez Spearman korrelációs tesztet használtuk.

Az IMT és érfali kalcium tartalom vizsgálatában a folyamatos változók normalitását Saphiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Mivel a változók nem voltak normál eloszlásúak, Spearman korrelációs és Friedman ANOVA teszteket használtunk.

A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása során a számított paraméterek a Saphiro- Wilk teszt alapján itt sem voltak normál eloszlásúak, emiatt a különböző érterületek paramétereit Spearman teszttel korreláltattuk és a különbségeiket Friedman ANOVA próbával vizsgáltuk. A kategórikus változók (betegek neme, bal kamra hypertrophia) hatását non-parametrikus Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk. A rizikófaktorok és egyéb klinikai adatok befolyásoló hatásának vizsgálatára többszörös lineáris regresszió analízist végeztünk.

Minden vizsgálatban a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket Statistica for Windows 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) programmal végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az IMT, a *Chlamydia* infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata

Huszonhét férfit és 40 nőt vizsgáltunk. A férfiak szignifikánsan fiatalabbak voltak, mint a nők (74 vs. 79 év, $p=0,009$). A stroke rizikófaktorok gyakoriságát a betegcsoportban az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat Stroke rizikófaktorok gyakorisága a vizsgált betegcsoportban (n=67)

Rizikófaktor	Gyakoriság
Hypertonia	53 (79%)
Diabetes mellitus	28 (42%)
Dohányzás	7 (10%)
Coronariasclerosis	46 (69%)
Symptomás arteria carotis stenosis	16 (24%)

2. táblázat *In vivo* az arteria carotis communisokban mért IMT, *post mortem* a három arteria carotis ágban mért átlag falvastagság és ezek irregularitás értékei.

	Vastagság, mm		Irregularitás (SD), mm	
	átlag	tartomány	átlag	tartomány
IMT (<i>in vivo</i>)	0,89	0,51-1,61	0,12	0,06-0,50
Átlag falvastagság (<i>post mortem</i>)				
Arteria carotis interna	1,03	0,64-2,28	0,21	0,02-0,49
Arteria carotis externa	0,96	0,58-1,58	0,18	0,09-0,34
Arteria carotis communis	1,43	0,93-2,28	0,12	0,05-0,23

Az arteria carotis communisban mért IMT átlagértékek (**2. táblázat**) a hypertóniával (0,9 vs. 0,83 mm $p=0,024$) és az életkorral (Spearman $r=0,25$, $p=0,05$) mutattak összefüggést. Az IMT irregularitásának, így az érfal egyenetlenségének jellemzésére betegenként meghatároztuk az IMT standard deviációját (**2. táblázat**). Ennek értéke az arteria carotis communisban magasabb volt a hypertóniás, mint a normotensiós betegekben (0,13 mm vs. 0,09 mm; $p=0,024$).

A *Chlamydia pneumoniae* infekció *in vivo* diagnózisához a nagy specificitású, *Chlamydia* külső membrán protein (OMP) ellenes IgG és IgA antitesteket használtuk. Az egyén élete során átvészelt fertőzést jelző IgG a vizsgáltak 73%-ában, 43 betegben volt pozitív. A közelmúltbeli vagy jelenleg is zajló fertőzésre utaló IgA antitesteket 29 esetben (49%) tudtunk kimutatni. Az IgA pozitív betegekben a CRP nem szignifikánsan, kissé magasabb volt, mint az IgA negatív betegekben (57,0 vs. 37,5 mg/l, $p=0,43$). Az IgG pozitív és IgG negatív betegekben mért IMT értékek nem különböztek egymástól (0,91 vs. 0,9 mm, $p=0,86$), ahogyan az IgA pozitív és IgA negatív egyének értékei sem mutattak szignifikáns különbséget (0,88 vs. 0,9 mm, $p=0,53$). Hasonlóan, az IMT irregularitása nem korrelált sem az IgG, sem az IgA antitestek jelenlétével. Fentiek alapján tehát a *Chlamydia pneumoniae* infekció szisztémás markerei nem mutattak összefüggést az arteria carotis communisok atherosclerosisának *in vivo* markereivel.

A carotisok atherosclerosisát és *Chlamydia pneumoniae* fertőzöttségét *post mortem* 40 elhunyt betegben vizsgáltuk. A három arteria carotis ágban meghatározott Átlag falvastagság és az *in vivo* mért arteria carotis communis IMT értékek közötti korrelációs koefficienseket és szignifikancia szinteket a **3. táblázatban** foglaltuk össze. Az arteria carotis communisban mért IMT szignifikánsan korrelál az arteria carotis communis és az arteria carotis externa falvastagságával, míg az arteria carotis interna falvastagságával nem. Az IMT és a falvastagság irregularitás (SD) értékeinek korreláció vizsgálatát is elvégeztük (**3. táblázat**). Csak az arteria carotis communis esetében találtunk gyenge korrelációt.

3. táblázat A három arteria carotis ágban *post mortem* mért átlag falvastagság és az *in vivo* mért arteria carotis communis IMT értékek és az irregularitások korrelációja [Spearman korrelációs együtthatók (r) és szignifikancia szintek (p)]. ACC= arteria carotis communis, ACI= arteria carotis interna, ACE= arteria carotis externa.

	ACC	ACI	ACE
Átlag falvastagság – ACC-IMT	$r=0,51$; $p=0,002$	$r=0,34$; $p=0,052$	$r=0,58$; $p<0,001$
falvastagság irregularitás – IMT irregularitás	$r=0,34$; $p=0,045$	$r=0,3$; $p=0,078$	$r=0,2$; $p=0,24$

Chlamydia pneumoniae specifikus DNS jelenlétét az oszlás közelében az arteria carotis communisban vagy az internában található jellegzetes, atheroscleroticus plakkokból a vizsgált 39 betegből 21 esetben (54%) sikerült igazolni PCR módszerrel. A DNS jelenléte

csaknem szignifikáns összefüggést mutatott az IgA jelenlétével (kappa érték: 0,357, $p=0,058$). A *Chlamydia pneumoniae* specifikus DNS jelenléte nem korrelált szignifikánsan sem az IMT-vel (0,93 vs. 0,95 mm, $p=0,46$), sem a *post mortem* mért átlagos érfalvastagsággal egyik carotis ág esetében sem (ACC: 1,36 vs. 1,37 mm, $p=0,95$; ACI: 1,00 vs. 0,97 mm, $p=0,74$; ACE: 0,93 vs. 0,83 mm, $p=0,2$). Szintén nem volt szignifikáns összefüggés a Chlamydia DNS kimutathatósága és az érfalvastagság irregularitása között.

4.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata

Ebben a vizsgálatban három, ischaemiás stroke-ban elhunyt beteg kétoldali arteria carotis communisait vizsgáltuk. *In vivo* IMT mérés történt, majd *post mortem* az érfali kalcium tartalmat mértük PIXE módszerrel. A betegek klinikai adatait a **4. táblázatban** foglaltuk össze. Az arteria carotis interna stenosis fokát az European Carotid Surgery Trial (ECST 1991) módszere alapján határoztuk meg. Az ultrahang képeken minden plakk hyperechogen volt.

4. táblázat A vizsgált betegek klinikai adatai. HT: hypertonia, DM: diabetes mellitus, KS: korábbi stroke, ASO: atherosclerosis obliterans, ISZB: ischaemiás szívbetegség, ACI: arteria carotis interna, ACM: arteria cerebri media, Jo: jobboldal, Bo: baloldal

Beteg	Élet -kor (év)	Nem	Cardiovascularis rizikófaktorok	Ultrahanggal meghatározott ACI stenosis (%)	Koponya CT	Halálok
1	79	Férfi	HT, DM, KS, ISZB, ASO	Jo: 20% Bo: 40%	Bal ACM területi territoralis infarktus	Tüdőembólia
2	100	Nő	HT, KS, ISZB	Jo: 30% Bo: 10%	Jobb ACM területi territoralis infarktus	Broncho- pneumonia
3	78	Nő	HT, DM, KS, ISZB	Jo: 20% Bo: 30%	Jobb ACM területi territoralis infarktus	Broncho- pneumonia

Az érminták adatai az **5. táblázatban** találhatóak. Erenként két ponton történt IMT és PIXE mérés, emiatt 12 mintát kaptunk. A 12 minta elemi kalcium tartalmának átlaga 6578 ± 3806 (átlag $\pm$ SD) parts per million-nak (ppm = $\mu\text{g/g}$ száraz súlyra vonatkoztatva) adódott, az IMT

átlag $1,0 \pm 0,37$ mm (átlag $\pm$ SD) volt. Az egyedi minták átlagos össz- kalcium tartalmának és IMT értékének korreláció vizsgálata nem igazolt szignifikáns összefüggést (Spearman $r=0,545$; $p=0,066$).

5. táblázat A vizsgálati minták adatai. UH: ultrahang, Ca: kalcium, ppm: parts per million.

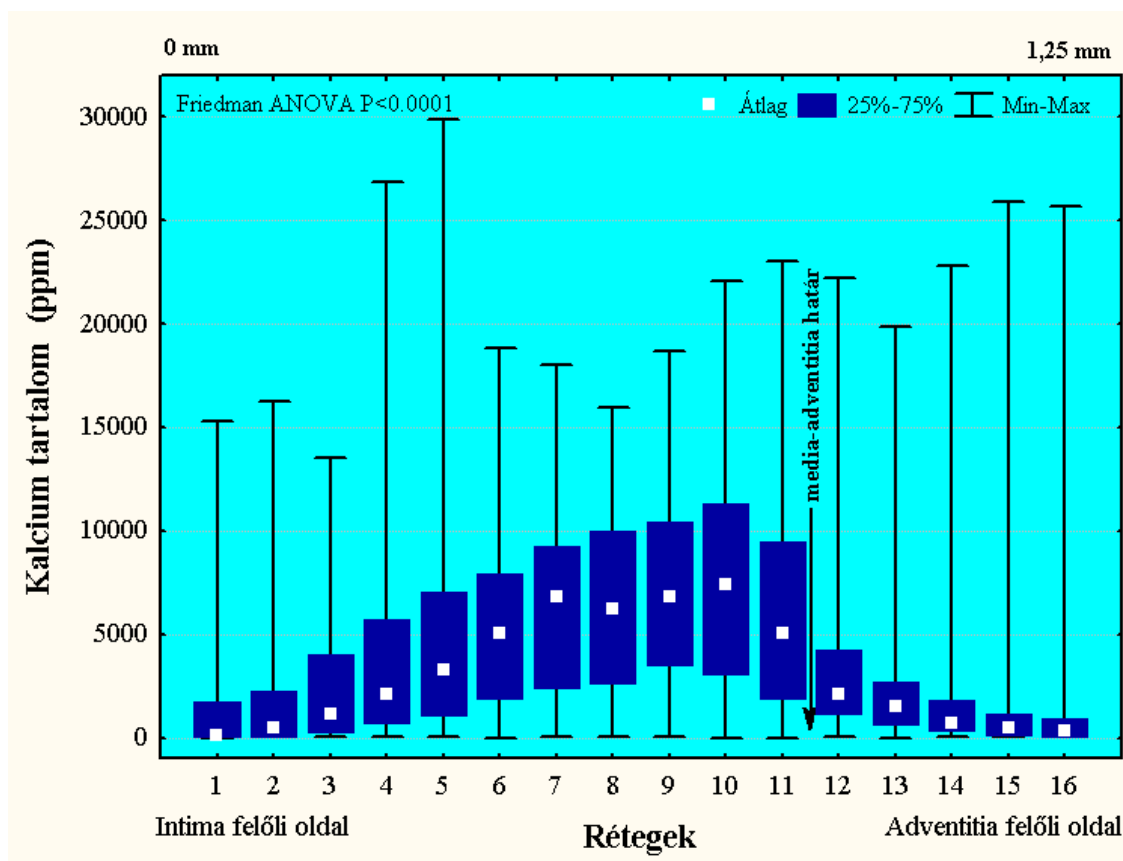
<i>Minta</i>	<i>Beteg</i>	<i>Oldal</i>	<i>UH szonda pozíció</i>	<i>IMT (mm)</i>	<i>A minták átlag Ca tartalma (ppm)</i>	<i>Felső Quartilis -ek Alsó Határértéke_i (ppm)</i>	<i>Egyesített Felső Quartilis_{a12} -ba eső pixelek száma (db)</i>
1	1	Bal	Anterior	0,78	4033	4219	37
2	1	Bal	Lateralis	0,833	4327	5494	45
3	1	Jobb	Anterior	0,89	4423	6021	48
4	1	Jobb	Lateralis	0,837	2494	2467	5
5	2	Bal	Anterior	0,847	3963	5102	47
6	2	Bal	Lateralis	0,877	4221	5563	49
7	2	Jobb	Anterior	0,783	7750	5987	57
8	2	Jobb	Lateralis	0,823	4666	6635	58
9	3	Bal	Anterior	1,015	15550	24053	130
10	3	Bal	Lateralis	0,987	9143	12493,5	121
11	3	Jobb	Anterior	1,207	7141	9268,5	82
12	3	Jobb	Lateralis	2,127	11230	11771	89

A nagy felbontású kalcium eloszlási térképeket (**4/a. ábra**) 16x16 pixel felbontású egyenlő részekre osztottuk a **4/b. ábrán** látható módon. Minden pixelben meghatároztuk a területére eső kalcium tartalmát. Minden egyes minta kalcium elemtérképében a pixelek kalcium tartalmát quartilisekre osztottuk, majd meghatároztuk a *Felső Quartilis Alsó Határérték_i* és ezt használtuk a további elemzés során. A *Felső Quartilis Alsó Határérték_i* szignifikáns korrelációt mutatott az IMT értékekkel (Spearman $r=0,69$; $p=0,01$).

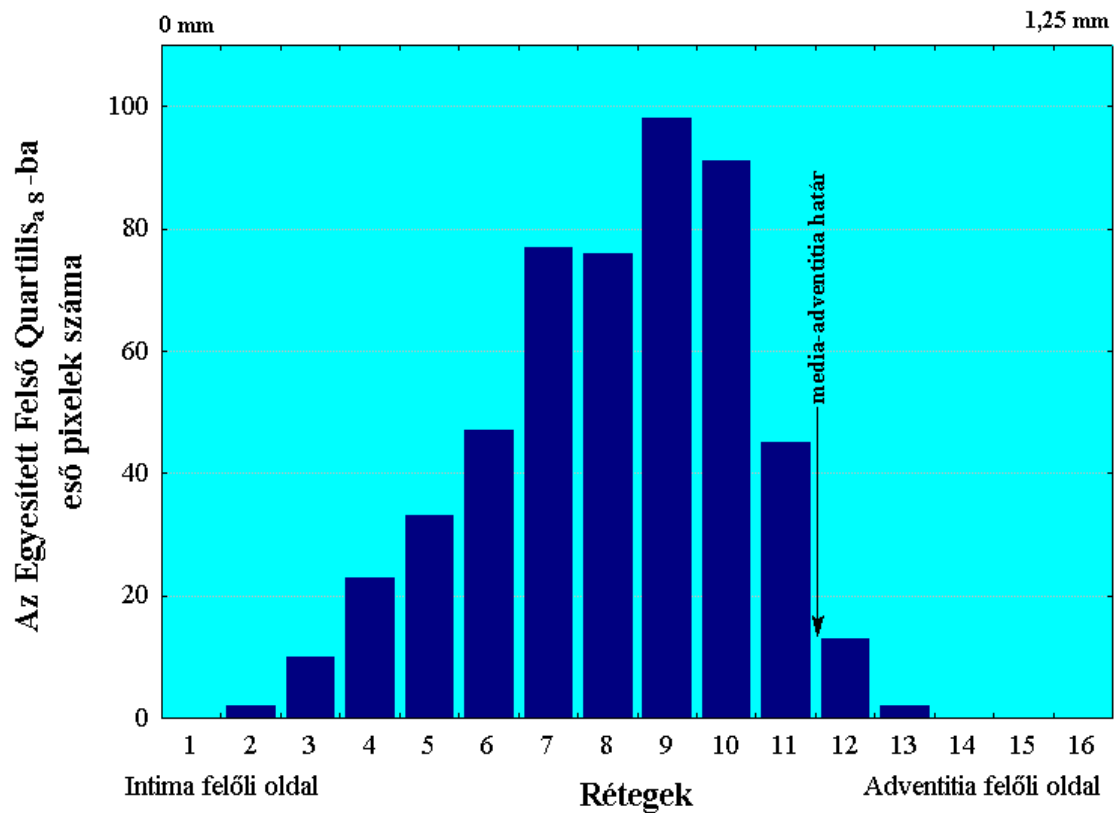
A 12 minta összes pixelét (12x16x16) egyesítve meghatároztuk az egyesített quartiliseket. Az egyes mintákban a kalcium lerakódás jellemzésére meghatároztuk az *Egyesített Felső Quartilis_a 12-ba eső pixelek számát* (**5. táblázat**), mely szintén szignifikánsan korrelált az azonos érmintákban mért IMT értékekkel (Spearman $r=0,66$; $p=0,02$).

Az $1,25 \times 1,25$ mm² méretű elemi kalcium eloszlási térképek széle a 12-ből 8 esetben volt megközelítően párhuzamos az intima - lumen határfelülettel. Ebben a 8 mintában a pixelekből 16 réteget képeztünk az intima irányából az adventitia felé haladva, majd

meghatároztuk a rétegenkénti átlagos kalcium tartalmat. Ahogy az a **7. ábrán** látható, a rétegek átlag kalcium tartalmát egyenlőtlen eloszlásúnak találtuk (Friedman ANOVA, $p < 0,0001$). Ha figyelembe vesszük, hogy a 8 minta átlagos IMT értéke $0,90 \pm 0,14$ mm és a rétegek vastagságából ($1,25/16 = 0,078125$ mm) számítva az 1.-11. rétegek vastagsága 0,859 mm, belátható, hogy az artériák falán belül elsősorban a tunica mediában rakódott le a kalcium. Ennek megerősítésére, a 8 mintára is meghatároztuk az *Egyesített Felső Quartilis*₈-ba eső pixelek számát (**8. ábra**). Ez alapján is megállapítottuk, hogy az érfal tunica mediajának megfelelő rétegekben a legmagasabb a kalcium tartalom.



7. ábra Az érfal rétegek átlagos kalcium tartalma 8 vizsgált minta esetében. A kalcium lerakódás elsősorban a tunica mediának megfelelő rétegekben jelentős.



8. ábra A 8 minta *Egyesített Felső Quartilis₈*-ába eső pixeleinek száma az érfal egyes rétegeiben.

4.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása

Az ischaemiás stroke -ban elhunyt 40 beteg 489 artériáját (kb. 2400 érszelet) vizsgáltuk *post mortem*, szám szerint ACI: n=65; ACE: n=73; ACC: n=76; AFS: n=70; APF: n=68; AFF: n=65; RIA: n=37; ACD: n=35. A betegek stroke rizikót jelentő társult betegségeit, a stroke eredetének TOAST klasszifikáció (Adams és mtsai 1993) szerinti besorolását az **6. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat A stroke-ban elhunyt 40 beteg stroke rizikó betegségei és a stroke TOAST szerinti besorolása szerinti felosztása. ISZB: ischaemiás szívbetegség, ASO: atherosclerosis obliterans, TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

<i>Stroke rizikófaktorok és társbetegségek</i>	<i>TOAST Nagyér (n=19)</i>	<i>TOAST Cardioembolias (n=19)</i>	<i>TOAST Ismeretlen (n=1)</i>	<i>TOAST Egyéb (n=1)</i>	<i>Összes</i>
Hypertonia, n (%)	11 (27,5)	16 (40)	1 (2,5)	1 (2,5)	29 (72,5)
Diabetes mellitus, n (%)	7 (17,5)	9 (22,5)	0	1 (2,5)	17 (42,5)
Hypercholesterinaemia, n (%)	3 (7,5)	4 (10)	0	0	7 (17,5)
Dohányzás, n (%)	5 (12,5)	1 (2,5)	0	0	6 (15)
ISZB, n (%)	12 (30)	12 (30)	1 (2,5)	0	25 (62,5)
ASO, n (%)	5 (12,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	8 (20)
Symptomás carotis stenosis, n (%)	11 (27,5)	0	0	0	11 (27,5)

Mivel szignifikáns különbséget találtuk az *Átlag falvastagság* és a *Számított átlag falvastagság* között, így a további elemzések során külön paraméterekként kezeltük őket. Spearman páronkénti összehasonlítást végeztünk a *Számított átlag falvastagság*, az *Érfal index* és az *Atherosclerosis index* (5. 6. és 7. paraméterek) esetében. Szignifikáns és következetes (mindhárom paraméter tekintetében egységesen szignifikáns) korrelációt találtunk az ACC és RIA, az ACI és ACE, az ACI és APF, valamint az ACI és az AFF elváltozásainak súlyossága között (**7. táblázat**). Nem volt viszont szignifikáns összefüggés az ACC és az ACI atherosclerosisának súlyossága között. A legerősebb korrelációkat a három femoralis artéria paraméterei között találtuk (AFF-APF-AFS). Az APF és RIA is mindhárom paraméterben következetesen korrelált, a korábbi megfigyelésekkel összhangban (**7. táblázat**). Az arteria carotis externa mindhárom érterületből származó erekkel következetes korrelációt mutatott, ellentétben az arteria carotis communissal.

7. táblázat A Számított átlag falvastagság (5. paraméter, 7/a táblázat), az Érfal index (6. paraméter, 7/b táblázat), és az Atherosclerosis index (7. paraméter, 7/c táblázat) értékek különböző érterületek közötti Spearman korrelációs együtthatói (r) és szignifikancia szintjei (Bonferoni korrekció nélkül). Az egyes érterületek közötti következetesen (mindhárom paraméter esetén) szignifikáns korrelációkat vastaggal szedtük. (Spearman páronkénti összehasonlítás, szignifikancia szint $p < 0,05$).

7/a táblázat

Sz. á. falv.	ACE	ACI	ACC	AFF	AFS	APF
RIA	0,349; p=0,034	0,261; p=0,112	0,336; p=0,038	0,408; p=0,014	0,436; p=0,006	0,442; p=0,006
ACD	0,254; p=0,153	0,387; p=0,023	0,341; p=0,048	0,474; p=0,007	0,308; p=0,07	0,452; p=0,008
APF	0,408; p=0,011	0,354; p=0,029	0,339; p=0,034	0,573; p=0,0002	0,616; p<0,001	
AFS	0,485; p=0,0017	0,195; p=0,232	0,034; p=0,834	0,731; p<0,0001		
AFF	0,471; p=0,004	0,381; p=0,021	0,217; p=0,19			
ACC	0,492; p=0,001	0,375; p=0,018				
ACI	0,392; p=0,015					

7/b táblázat

Érfal index	ACE	ACI	ACC	AFF	AFS	APF
RIA	0,444; p=0,006	0,345; p=0,036	0,534; p=0,00065	0,339; p=0,049	0,323; p=0,051	0,409; p=0,013
ACD	0,019; p=0,914	0,097; p=0,57	0,056; p=0,74	0,243; p=0,18	0,225; p=0,19	0,346; p=0,045
APF	0,427; p=0,007	0,371; p=0,021	0,089; p=0,59	0,652; p<0,0001	0,618; p<0,0001	
AFS	0,322; p=0,046	0,026; p=0,87	0,066; p=0,68	0,679; p<0,00001		
AFF	0,323; p=0,054	0,39; p=0,018	0,18; p=0,28			
ACC	0,522; p=0,0006	0,30; p=0,056				
ACI	0,407; p=0,011					

7/c táblázat

Athscl. index	ACE	ACI	ACC	AFF	AFS	APF
RIA	0,384; p=0,017	0,251; p=0,12	0,341; p=0,035	0,233; p=0,18	0,126; p=0,45	0,393; p=0,016
ACD	0,574; p=0,0004	0,276; p=0,11	0,246; p=0,16	0,125; p=0,49	0,23; p=0,19	0,201; p=0,26
APF	0,524; p=0,0006	0,550; p=0,0003	0,265; p=0,1	0,498; p=0,0016	0,606; p=0,00004	
AFS	0,276; p=0,08	0,133; p=0,41	0,159; p=0,32	0,558; p=0,0003		
AFF	0,531; p=0,0007	0,356; p=0,033	0,314; p=0,058			
ACC	0,242; p=0,13	0,173; p=0,29				
ACI	0,407; p=0,01					

Az anamnézis és a boncolási adatok alapján megállapított ischaemiás szívbetegségben szenvedő 25 beteg adatait külön is elemeztük, hogy kiküszöböljük a súlyos koszorúér-betegség eredményeket torzító hatását. Az alcsoport elemzés során ugyanazon korrelációk bizonyultak szignifikánsnak, mint a teljes anyagban.

A vascularis rizikófaktorok (diabetes, hypercholesterinaemia, dohányzás, hypertonia) és az egyéb releváns klinikopatológiai tényezők (nem, atherosclerosis obliterans, symptomás carotis stenosis, ISZB, a stroke TOAST besorolása) befolyásoló hatásának vizsgálatára többszörös lineáris regresszió analízist végeztünk. A korrelációk az ACC-RIA és az ACI-ACE párok kivételével változatlanok maradtak (**8. táblázat**).

A boncolás során diagnosztizált bal kamra hypertrophia (mely a fontos rizikófaktorok jelenlétének időtartamával függ össze) megléte vagy hiánya szerint képzett betegcsoportok *Atherosclerosis indexei* között nem találtunk szignifikáns különbséget, mely szintén a többszörös lineáris regresszió eredményét támasztja alá.

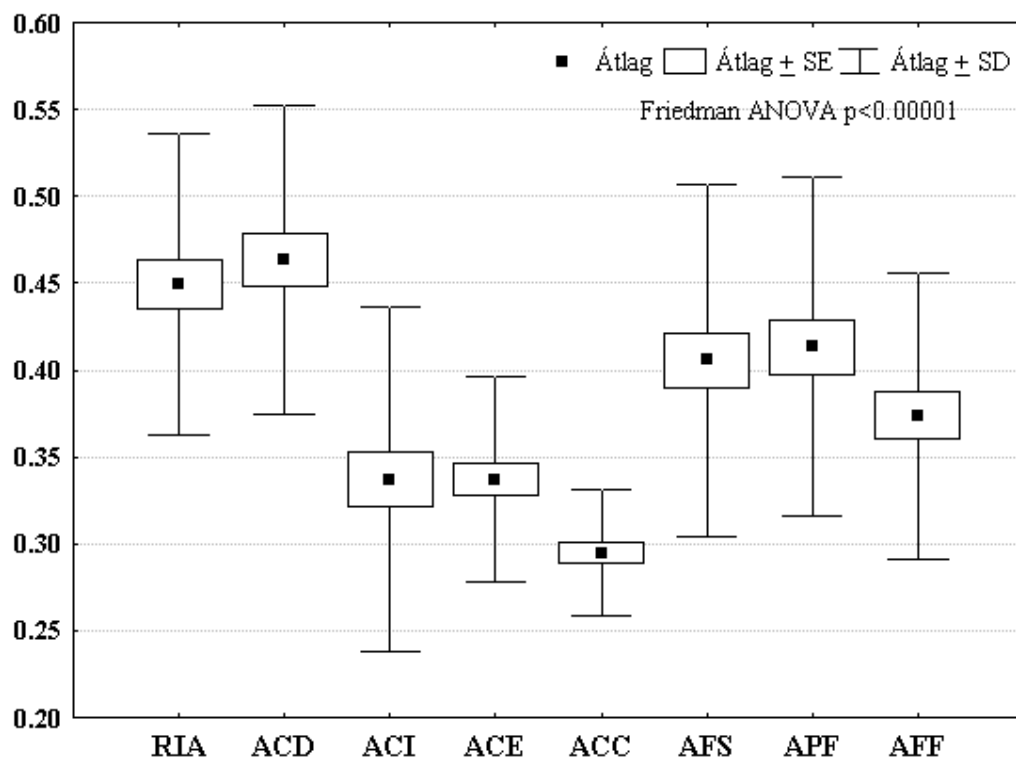
8. táblázat Az *Atherosclerosis index* paraméterek (7. paraméter) közötti Pearson korrelációs együtthatók és szignifikancia szintek a többszörös lineáris regresszióanalízis után

Összehasonlítás	Pearson's R	p
ACE-ACI	0,275	0,184
ACE-RIA	0,458	0,028
ACE-ACD	0,668	0,001
ACE-APF	0,473	0,017
ACI-APF	0,457	0,022
ACI-AFF	0,459	0,028
ACC-RIA	0,364	0,081
APF-RIA	0,513	0,012
APF-AFF	0,667	<0,000
APF-AFS	0,688	<0,000
AFF-AFS	0,468	0,021

Az atherosclerosis súlyossága különbözött az egyes érterületekben. A *Relatív érfalterület* enrenkénti megoszlását a **9. táblázatban**, míg az *Érfal index* értékeket a **9. ábrán** ábrázoltuk.

9. táblázat A *Relatív érfalterület* (2. paraméter) egyes quartiliseibe eső erek száma

<i>Rel.érf.ter.</i>	<i>ACI</i>	<i>ACE</i>	<i>ACC</i>	<i>AFS</i>	<i>APF</i>	<i>AFF</i>	<i>RIA</i>	<i>ACD</i>
0,76-0,99	2	0	0	3	6	2	14	11
0,51-0,75	20	28	16	34	31	31	23	22
0,26-0,5	18	12	24	3	3	7	3	7
0-0,25	0	0	0	0	0	0	0	0



9. ábra A vizsgált erek *Érfal index* (6. paraméter) értékeinek átlaga. A magasabb értékek súlyosabb atheroscleroticus elváltozást jeleznek. (Friedman ANOVA, $p < 0.00001$).

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az IMT, a *Chlamydia* infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata

A vizsgálat újdonsága az összehasonlító, kliniko-patológiai megközelítés, mely során mind az atherosclerosis, mind a *Chlamydia pneumoniae* infekció *in vivo* és *post mortem* markereit hasonlítottuk össze egymással. Az atherosclerosis markerei közül az IMT az atherosclerosis korai fázisát jellemzi, mely az endothelialis dysfunctio és az atheroscleroticus plakk-képződés közé esik. A mérési technika standardizálása a 2004-ben létrehozott, majd 2006-ban felülvizsgált Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus-sal jött létre, így az ezen elvek szerint történt vizsgálatok összehasonlíthatók (Touboul és mtsai 2004, 2007). Az általunk *post mortem* mért átlagos falvastagság az *in vivo* mért az IMT-vel jellemzett enyhe érfal-vastagodást és a makroszkópos, plakk képződéssel járó érfali elváltozásokat is magába foglalva jellemzi a vizsgált erekben jelenlévő atherosclerosis súlyosságát. Az érfalvastagság egyenetlensége ezzel szemben véleményünk szerint döntően a plakkok által okozott fal egyenetlenségek mérőszáma.

Az *in vivo* mért IMT és a *post mortem* mért Átlag falvastagság az arteria carotis communis és az arteria carotis externa esetében jól korrelált, melyet magyaráz a falvastagság és az IMT fent említett összefüggése. Az IMT és a falvastagság irregularitása azonban csak az arteria carotis communis esetében mutatott gyenge korrelációt, mely a kéttípusú mérés által jellemzett elváltozások különbözőségét támasztja alá.

A klasszikus rizikófaktorok közül a hipertonia és az életkor gyakorolt szignifikáns hatást az IMT-re, mely a kis betegszám ellenére is validnak tartható, mivel egyezik a korábbi tanulmányok eredményével (Salonen és mtsai 1990, Simon és mtsai 2002, Páll és mtsai 2003).

A *Chlamydia pneumoniae* infekció szisztémás markerei, az IgG és IgA antitestek kimutatását ELISA rendszerrel végeztük. A fertőzés szerológiai diagnosztikája a mai napig nem standardizált (Ieven és Hoymans 2005). Az IgG szeropozitívak aránya az általunk vizsgált betegek között (73%) megegyezik a hasonló korú átlagpopuláció adatával, míg az IgA pozitivitás (49%, az IgG pozitívak 67%-a) a más tanulmányokban leírtánál jóval magasabb. Utóbbi alapján arra következtethetünk, hogy az akut stroke-betegek között nagy

arányban van jelen *Chlamydia pneumoniae* fertőzés (Leowattana és mtsai 2000, Bellido-Casado és mtsai 2006). A *Chlamydia pneumoniae* jelenléte (IgA pozitivitás) és a szisztémás gyulladásos marker CRP között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Ez is a szisztémás, akut *Chlamydia* fertőzés és annak pneumóniát okozó halálloki szerepe ellen szól a vizsgált stroke-betegek esetében. Sem az IgG, sem az IgA státusz nem gyakorolt hatást az IMT-re, ahogyan az IMT irregularitása sem korrelált sem az IgG, sem az IgA antitestek jelenlétével. Fentiek alapján tehát a *Chlamydia pneumoniae* infekció szisztémás markerei nem mutattak összefüggést az arteria carotis communisok atherosclerosisának *in vivo* markereivel.

A *Chlamydia* infekció lokális jelenlétét a legbiztosabb módszerrel, a *Chlamydia* specifikus DNS kimutatásával bizonyítottuk a vizsgált személyek 54%-ának atheroscleroticus plakkjaiban. Ez a gyakoriság hasonló az irodalomban leírtakhoz (Janczak és mtsai 2004, Cochrane és mtsai 2005). Lokálisan a plakkokban a *Chlamydia* DNS jelenléte közel szignifikáns összefüggést mutatott az IgA jelenlétével, de nem mutatott szignifikáns összefüggést az IgG jelenlétével, mivel az IgG az élet során bekövetkezett átfertőződést jellemző, az IgA pedig a jelenleg is aktív fertőzésre adott szisztémás immunválaszt mutató szerológiai marker (Cochrane és mtsai 2005). Vizsgálatunkban a PCR és az IgA eredmények között talált közel szignifikáns összefüggés az alkalmazott DNS kimutatási módszer biológiai validitását sugallja.

A *Chlamydia* DNS jelenléte sem az *in vivo*, sem a *post mortem* morfológiai markerekkel (IMT és falvastagság, ill. falegyenetlenség) nem volt összefüggésben.

A *Chlamydia pneumoniae* gyakori kórokozó, mely érfali és gyulladásban résztvevő sejteket is képes megfertőzni. Egy metaanalízis szerint az okozati összefüggésre nincs bizonyíték, mivel a kórokozó és az atherosclerosis között összefüggést csak keresztmetszeti és nem követéses tanulmányokban találtak (Bloemenkamp és mtsai 2003). Az általunk végzett keresztmetszeti tanulmányban a *Chlamydia pneumoniae* infekció szisztémás és lokális markereit is nagy arányban detektáltuk a vizsgált ischaemiás stroke-ot szenvedett betegcsoportban. A nagyarányú kimutathatóság ellenére a *Chlamydia pneumoniae* infekció nem korrelált az atherosclerosis súlyosságával. Ezek alapján vizsgálatunk sem támasztja alá a feltételezést, miszerint szoros kapcsolat van a *Chlamydia* infekció és az atherosclerosis folyamata között. Ezért a klinikai gyakorlatban az atheroscleroticus betegségben szenvedők gondozása során nem javasoljuk a *Chlamydia pneumoniae* szerológia vizsgálatát, illetve az antibiotikus kezelést addig, míg egyértelmű tudományos eredmények alá nem támasztják a fertőzés és az atherosclerosis közötti kapcsolatot.

5.2. Az érfali kalcium tartalom vizsgálata

Ebben a vizsgálatban 3 beteg 2 oldali arteria carotis communisainak 12 falrészletében hasonlítottuk össze az *in vivo* mért IMT értékeket az érfalban *post mortem*, PIXE módszerrel meghatározott lokális kalcium tartalommal, valamint a kalcium érfalon belüli lokalizációját vizsgáltuk. Mivel az IMT jól dokumentált cardiovascularis rizikó marker, megvizsgáltuk, hogy az érfali kalcifikáció korai stádiumával összefüggésbe hozható-e. Másrészt, a kalcium lerakódás lokalizációja volt vizsgálatunk tárgya, mivel a folyamat korai fázisában érintett érfalrétegről kevés a rendelkezésre álló információ (Tohno és Tohno 1998). Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, mely az *in vivo*, ultrahanggal mért IMT-t és *post mortem*, PIXE módszerrel meghatározott elemi kalcium eloszlási térképeket hasonlítja össze.

Az IMT értékek és az ugyanazon érminták átlagos össz-kalcium tartalma közötti korreláció csak tendenciát jelzett, de nem volt szignifikáns (Spearman $r = 0,545$, $p = 0,066$). A PIXE térképeken látható igen egyenlőtlen kalcium eloszlás miatt azt is megvizsgáltuk, vajon a legkifejezettebb kalcifikációt mutató területek kalcium tartalma korrelál-e az IMT-vel. A 16x16 pixel felbontásúra alakított eloszlási térképek alapján számított *Felső Quartilis Alsó Határértéke_i*, valamint 12 minta összes pixelének adatait tartalmazó *Egyesített Felső Quartilis_{a12}*-ba eső pixelek száma (Spearman $r = 0,66$; $p = 0,02$) is szignifikánsan korrelált az azonos érmintákban mért IMT értékekkel. Egy hasonló összehasonlításban Allison és mtsai (2005) is szignifikáns összefüggést találtak az arteria carotis communisban mért IMT és az elektron nyaláb CT-vel mért carotis mészlerakódás között. Véleményük szerint is az IMT jó jelzője az atheroscleroticus kalcifikációnak.

A kalcium lerakódás érfalon belüli lokalizációját 8 érmintán vizsgáltuk, melyeket 16 rétegre osztottunk. A rétegek kalcium tartalma szignifikánsan különbözött egymástól és a kalcium akkumuláció elsősorban a 4. és 11. rétegek között jelentkezett, mely az artériafal tunica mediájának felel meg. Ezt erősíti meg az *Egyesített Felső Quartilis_{a8}*-ba eső pixelek száma is, mely szintén a tunica mediát reprezentáló rétegekben mutat legmagasabb kalcium tartalmat. Hasonló eredményre jutott Tohno és Tohno (1998) a mellkasi aorta vizsgálatánál, ahol a kalcium lerakódás legkorábban a tunica mediában jelentkezett, az intima érintettségét csak idősebb életkorban észlelték. Az arteria femoralis esetében nem volt ilyen egyértelmű kapcsolat a kalcifikáció térbeli és időbeli kapcsolatában.

Az IMT és a *post mortem* vizsgálatokhoz a minták kiválasztása során olyan érszakaszokat választottunk, melyekben nem voltak atheroscleroticus plakkok. A PIXE képek ennek ellenére jelentős kalcium lerakódást mutattak az érfalakban. A mintavételezési

helyeken kívül a vizsgált erekben csak kisméretű, érdemi szűkületet nem okozó plakkokat találtunk, melyek mindegyike hyperechogen és homogén volt. A kis mintaszám és az egységesen kisméretű plakkok miatt az IMT és a plakk morfológia, valamint a szűkület súlyossága között nem tudtunk összefüggést kimutatni. Ezen összefüggések vizsgálatára nagyobb elemszámú, prospektív vizsgálat szükséges.

Az atherosclerosis folyamatának kezdeti lépése, az endothel sérülése, mely után az LDL-cholesterol a subendothelialis térbe kerülhet, ezt a macrophaggá alakuló monocyták felveszik, habos sejteket képezve. A sérült endothel miatt szabaddá váló subendothelialis collagen thrombocytá adhéziót, a felszabaduló cytokinek következményes simaizomsejt migrációt és proliferációt indukálnak. A simaizomsejtek által termelt kollagénben gazdag kötőszöveti mátrix a lipidmaggal együtt fibrosus plakkot alakít ki. Az előrehaladott stádiumban kalcium foszfát rakódik le a plakkban vagy a megvastagodott érfalban, melynek legstabilabb formája a hidroxipatit. A kalcifikáció folyamata nem teljesen tisztázott, de az eddigi adatok szerint jól szervezett, szabályozott folyamat, mely a csontszövetben zajló folyamatokhoz hasonló (Doherty és mtsai 2003, Higgins és mtsai 2005). A nem differenciált vascularis simaizomsejtek játszanak benne központi szerepet, számos faktor hatására kalcium szekretáló sejtekké alakulhatnak, míg más faktorok gátolják az ilyen irányú differenciálódást. A csontosodásban is szerepet játszó faktorok közül a matrix vezikulumok, BMP-2, osteopontin, osteocalcin, collagen I, mátrix glia protein, csont morfogén protein és a sialoprotein szerepe bizonyított (Demer 1995, Demer és Tintut 1999, Deneke és mtsai 2001, Parhami és mtsai 2001, Vattikuti és mtsai 2004). Az oxidált lipidek jelenléte igen fontos az érfal kalcifikációjában, melyek a csontszövetben gátolják a csontképződést, ezzel újabb bizonyítékot szolgáltatva a csontanyagcsere és az érlemezsedés folyamata közötti szoros kapcsolatra (Higgins és mtsai 2005). Van olyan szélsőséges vélemény is, mely szerint az érfalban is a csontéhoz hasonló ásványanyag homeostasis működik és a kalcium leakódás pedig az osteoblast és az osteoclast szerű sejtek működése közötti egyensúly kóros szabályozás miatti megbomlására vezethető vissza (Doherty és mtsai 2002). Vizsgálataink szerint a kalcium lerakódás már jóval az ultrahanggal detektálható plaque-képződés előtt megindul és elsősorban a tunica mediában kimutatható.

A megvastagodott IMT az érfal tunica mediájában proliferálódó simaizomsejtek következménye is lehet (Newby és Zaltsman 2000). A simaizomsejtek kalcium szekretáló sejtekké differenciálódása a tunica mediában kalcifikációhoz vezet. Az általunk végzett keresztmetszeti vizsgálatban a PIXE módszer és ultrahang vizsgálat segítségével kimutattuk a korai kalcium akkumulációt a carotisok tunica media rétegében. Eredményeink szignifikáns

összefüggést igazoltak az arteria carotis communisokban PIXE módszerrel mért érfali kalcium tartalom és az azonos érfal részleteken mért IMT között. Véleményünk szerint az általunk alkalmazott PIXE módszer alkalmas lehet az atherosclerosis korai stádiumát kutató tudományos vizsgálatokban az érfali kalcifikáció igen precíz, kvantitatív és lokalizációs követésére. Állatkísérletekben az atherosclerosis befolyásoló gyógyszerek (pl. statinok) hatásának vizsgálatában tartjuk leginkább ígéretesnek ezt a fizikai módszert a biológiai módszerekkel ötvözve. A humán atherosclerosis-kutatásban inkább az *in vivo* is alkalmazható, non-invazív vizsgálómódszereknek (pl. elektron-nyaláb CT) van jövője.

5.3. A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása

Arteria carotis communis

A teljes érhálózat atherosclerosisának becslésére leggyakrabban az arteria carotis communis (ACC) atheroscleroticus elváltozásait használják, mivel ez a legkönnyebben vizsgálható felszínhez közeli nagyartéria (Salonen és Salonen 1991, Wendelhag és mtsai 1993, Adams és mtsai 1995, Pasterkamp és mtsai 1998). Az ACC-ban mért IMT cardiovascularis eseményeket prognosztizáló értékét is igazolták (Agewall és mtsai 2001). A Cardiovascular Health Study-ban közel 6000 résztvevőn azt találták, hogy a vastagabb ACC- IMT cardiovascularis előzmények nélküli idősebb egyéneknél is magasabb szívinfarktus és stroke rizikóval társul (O'Leary és mtsai 1999). Egy másik vizsgálatban (több mint 6400 egyénben) az IMT és a Framingham risk score korrelált szignifikánsan (Touboul és mtsai 2007). Ezen eredmények és korábbi tanulmányok miatt a carotis communis IMT-t a cardiovascularis betegségek kiegészítő markerének tekintik (Bots 2006).

Egy francia vizsgálatban neurológiai osztályon elhunyt betegek boncolási anyagában szoros összefüggést találtak a coronariasclerosis előfordulási gyakorisága és az arteria carotisokban, vagy az egyéb, agyat ellátó erekben talált atherosclerosis súlyossága között (Gongora-Rivera és mtsai 2007). Más vizsgálatokban a carotis plakkok területét megbízhatóbb coronariabetegség indikátornak találták, mint az IMT-t (Spence 2002, Brook és mtsai 2006, Johnsen és mtsai 2007).

Vizsgálatunkban az arteria carotis communis atheroscleroticus markerei kizárólag a bal arteria coronaria RIA ágával korreláltak, de a rizikófaktorokra történt korrekció után ez az összefüggés sem bizonyult szignifikánsnak. A korábbi és a saját eredmények közötti

ellentmondás magyarázható az atheroscleroticus elváltozások különböző megközelítésével. Míg az IMT a korai stádiumú, plakkmentes érfal-elváltozások markere, addig az általunk használt paraméterek az atherosclerosis előrehaladottabb stádiumában tapasztalható súlyosabb elváltozásokat írják le pontosan mind az arteria carotisok, mind az arteria coronariák vonatkozásában. Ezért úgy gondoljuk, hogy eredményünk nem ellentmond a korábbi megfigyeléseknek, hanem kiegészíti azokat az általunk használt egységes értékelési módszer eredményével.

Néhány szerző összefüggést talált az arteria carotis communis falvastagsága és az alsó végtagi érbetegség között (Allan és mtsai 1997, Pasterkamp és mtsai 1998). Mi nem találtunk szignifikáns korrelációt az ACC és az arteria femoralisok paraméterei között, hasonlóan Pasterkamp-hoz, aki csak gyenge összefüggést észlelt az ACC és más perifériás artériák plakk-terheltsége között. Espeland (2003) IMT alapú megfigyeléséhez hasonlóan mi sem találtunk szoros összefüggést az arteria carotis communis és az interna elváltozásai között.

Arteria carotis interna

Vizsgálatunkban a korábbi megfigyelésekkel ellentétben nem találtunk összefüggést az arteria carotis interna és az arteria coronariák atheroscleroticus markerei között (Lekakis és mtsai 2000, Hulthe és mtsai 1997). Szoros összefüggés volt viszont az ACI és a femoralis artériák elváltozásai között, hasonlóan más vizsgálatokhoz (Long és mtsai 1999, Kawarada és mtsai 2003).

A femoralis artériák

A coronaria és femoralis artériák közötti korrelációk figyelemre méltók, különösen, ha elemezzük a változó eredményű korábbi vizsgálatokat (Hulthe és mtsai 1997, Khoury és mtsai 1997, Megnien és mtsai 1998, Lekakis és mtsai 2000, Cerne és Krajnc 2002, Pasierski és mtsai 2004, Kafetzakis és mtsai 2005). Hulthe (1997) nem talált szignifikáns összefüggést az arteria femoralis főtrzs (AFF) IMT-je vagy plakkjai és az arteria coronariák stenosisa között. Lekakis (2005) viszont szignifikáns összefüggést talált az AFF- IMT és a coronaria betegség rizikója között. Egy harmadik vizsgálatban az arteria femoralis IMT volt az egyetlen független paraméter, mely a coronariasclerosist jellemző Gensini score-al korrelált (Lekakis és mtsai 2000). Megnien (1998) a coronaria kalcium tartalom és az arteria femoralisban talált plakkok között talált összefüggést. Más vizsgálatokban az arteria femoralisok plakk- terheltsége és az arteria femoralis IMT a szignifikáns coronaria-betegség

erősebb jelzőjének bizonyult, mint az arteria carotis communisokban mért hasonló paraméterek (Khoury és mtsai 1997, Pasierski és mtsai 2004). Sajnos ezek a vizsgálatok csak az arteria femoralis főtörzseket használták fel az összehasonlításokhoz. *A mi adataink egyértelmű korrelációt mutattak az arteria femoralisok és a coronariák között, különösen az arteria profunda femoris (APF) vonatkozásában.* A saját és a korábbi vizsgálatok közötti különbségek a mérési technikák és a mért paraméterek különbözőségéből adódhattak. A legtöbb korábbi vizsgálat csak az AFF-ben mért IMT-t használta, míg mások a plakkok számát határozták meg a femoralis arteriákban. Mi 7 paramétert használtunk az érfali elváltozások minél pontosabb leírására, valamint minden vizsgált ér esetén az egész értékelhető érszakasz adatait vettük figyelembe, ellentétben az IMT mérés lokális, plakkmentes szegmentumával. Ez a megközelítés az atheroscleroticus elváltozások sokkal megbízhatóbb becslését teszi lehetővé, mint az IMT mérés.

Regionális különbségek

Az atherosclerosis súlyossága szignifikánsan különbözött az egyes érterületekben. Mind a *Relatív érfal terület*, mind az *Érfal index* adatok alapján az atherosclerosis legsúlyosabban az arteria coronariákat érintette. Az arteria femoralisok atherosclerosis enyhébb volt, az arteria carotisokban találtuk a legkevésbé súlyos elváltozásokat. Az arteria carotis communisban voltak legenyhébbek, míg a három carotis közül az externában a legsúlyosabbak az elváltozások. Az utóbbi is alátámasztja a Spearman korreláció során kapott összefüggéseket, mely szerint az arteria carotis externák atherosclerosis mindhárom érterület adataival korrelált, ellentétben a legtöbb korábbi vizsgálatban szereplő arteria carotis communissal.

A három érterület közötti különbség leginkább a haemodinamikai paraméterekre vezethető vissza. Geometriai tényezőket (pl. az ACI eredési szöge vagy az erek görbületei) figyeltek meg az atheroscleroticus elváltozások kialakulási helyének és rizikójának háttérben (Smedby 1998, Sitzer és mtsai 2003). A zavart, turbulens áramlású régiók sokkal fogékonyabbak az atherosclerosis kialakulására, mint a szabályos, laminaris áramlású érszakaszok (Smedby és mtsai 1996). A plakk képződés legkifejezettebb az alacsony és oscilláló érfali nyíróerőnek kitett részekben, mely a turbulens áramlással, ezáltal az arteriák elágazásaival van szoros összefüggésben (Ku és mtsai 1985, Glagov és mtsai 1988, 1992). Ez magyarázhatja, hogy az arteria carotis externa és az arteria profunda femoris elváltozásai miért jelzik jobban a súlyos coronariasclosist, mint az arteria carotis communis eltérései. Az ACE és az APF számos helyen elágazik (következésképpen nagyobb a lehetőség a

turbulens áramlás kialakulására), ugyanúgy, mint az arteria coronariák, ezzel szemben az arteria carotis communis esetében ilyen áramlási zavar kialakulására nincs lehetőség.

Vizsgálatunk korlátai

Az agyi nagyartériák vizsgálta igen értékes információkat adott volna a tanulmányhoz, de azok kis mérete, sérülékenysége miatt a feltöltési eljárás nem kivitelezhető. A vizsgált kohortba idős, ischaemiás stroke-ban elhunyt betegeket válogattunk be, emiatt vizsgálatunk eredményei ezen populációra érvényesek.

Összefoglalva, eredményeink azt igazolják, hogy az arteria carotis communisban végzett IMT mérésen túl, mely a coronariasclerosis súlyosságának gyakran használt indikátora, egyéb erek elváltozásait is vizsgálni kell a coronariasclerosis és a globális atheosclerosis becslésére. Véleményünk szerint az arteria carotis externa és az arteria femoralisok (elsősorban az arteria femoralis főtrzs és az arteria profunda femoris) érzékenyebb markerei a generalizált atherosclerosisnak, mint az arteria carotis communis. A napi rutinba ültetve ez azt jelenti, hogy a carotisok neuroszonológiai vizsgálata során a sokszor nem is vizsgált arteria carotis externa tanulmányozása klinikailag fontos információt biztosíthat, a coronariasclerosis és a cardiovascularis morbiditás fontos rizikómarkerének tekinthető. Az arteria carotis externa (és a femoralis artériák) értékei egy kifejlesztendő pontozóskála részei lehetnének (nagyobb betegpopuláció adataira támaszkodva).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkat súlyos ischaemiás stroke-ban szenvedő betegeken végeztük. Összehasonlító klinikopatológiai megközelítést alkalmaztunk. In vivo a kardiovaszkuláris rizikófaktorokat, a *Chlamydia pneumoniae* infekció szerológiai markereit és az arteria carotis communisban ultrahanggal mért intima-media vastagságot (IMT) vizsgáltuk. Post mortem az arteria carotisok plakkjaiban *Chlamydia pneumoniae* jelenlétét kerestük, az arteria carotis communisok falában a kalcium lerakódás lokalizációját és mennyiségét vizsgáltuk, továbbá a carotis, femoralis és coronaria artériák egyes szakaszainak atherosclerosis okozta elváltozásainak súlyosságát elemeztük és hasonlítottuk össze.

➔ Az IMT, a *Chlamydia* infekció és a carotis atherosclerosis kapcsolatának vizsgálata során az in vivo mért IMT és a post mortem mért átlag falvastagság az arteria carotis communis és az externa esetében jól korrelált. A *Chlamydia pneumoniae* infekció szisztémás markerei (az IgG és IgA antitestek) nem mutattak összefüggést az arteria carotis communisok atherosclerosisának in vivo markereivel (IMT és irregularitás). Lokálisan a plakkokban a *Chlamydia* DNS jelenléte nem mutatott szignifikáns összefüggést sem az IgA, sem az IgG jelenlétével. A *Chlamydia* DNS jelenléte sem az in vivo, sem a post mortem morfológiai markerekkel (IMT és falvastagság, ill. egyenetlenség) nem függött össze. *A gyakori előfordulás ellenére a Chlamydia pneumoniae infekció nem korrelált a carotis atherosclerosis súlyosságával. Ezek alapján vizsgálatunk nem támasztja alá a feltételezést, miszerint szoros kapcsolat lenne a Chlamydia infekció és az atherosclerosis súlyossága között.*

➔ Az IMT és az érfali kalcium tartalom kapcsolatának vizsgálata során mi hasonlítottuk össze először az in vivo, ultrahanggal mért IMT-t a post mortem, PIXE módszerrel meghatározott érfali kalcium elemtérképekkel. Megállapítottuk, hogy a PIXE módszer alkalmas nativ érszeleteken kalcium regionális eloszlásának vizsgálatára. *Kimutattuk a korai kalcium akkumulációt a carotisok tunica media rétegében és szignifikáns összefüggést találtunk az érfali kalcium tartalom és az azonos érfal részleteken mért IMT között.*

➔ A különböző érterületek atherosclerosisának patológiai összehasonlítása során kapott eredményeink azt igazolják, hogy az arteria carotis communisban végzett IMT mérésen túl, mely a coronariasclerosis gyakran használt indikátora, egyéb -ultrahang számára jól hozzáférhető- erek elváltozásait is vizsgálni kell a coronariasclerosis és a globális atherosclerosis megbecsléséhez. *Véleményünk szerint az arteria carotis externa és az arteria femoralisok legalább olyan érzékeny markerei a generalizált atherosclerosisnak, mint az arteria carotis communis.*

6. SUMMARY

Our examinations were performed on patients with severe acute ischemic stroke. A comparative clinico-pathological approach was applied. Cardiovascular risk factor screening, serological marker analysis of *Chlamydia pneumoniae* infection, and common carotid artery intima-media thickness measurements were performed *in vivo*. The presence of *Chlamydia pneumoniae* in the carotid plaques, localisation and quantity of calcium accumulation were examined *post mortem*. Further on, the atherosclerotic changes of the carotid, femoral and coronary arteries were analyzed and compared.

➔ In the comparison of IMT, Chlamydia infection and carotid atherosclerosis, good correlation was found between *in vivo* common carotid IMT and post mortem measured average wall thickness data of the common and external carotid arteries. Systemic markers of *Chlamydia pneumoniae* infection (IgG and IgA antibodies) did not show correlation with the *in vivo* markers of the common carotid artery atherosclerosis (IMT and its irregularity). Local presence of the Chlamydial DNA correlated neither with presence of IgA nor with that of IgG antibodies. Further on, presence of Chlamydial DNA was independent of either *in vivo* or post mortem morphological markers of atherosclerosis. *In spite of a high detectability rate, Chlamydia pneumoniae infection did not correlate with the severity of atherosclerosis. Therefore our study does not support the link between Chlamydia infection and atherosclerosis.*

➔ In the study comparing arterial wall calcium content and IMT, we were the first to compare ultrasonographically measured IMT and elementary calcium distributional maps in post mortem specimens determined by the PIXE method. *Early calcium accumulation was detected in the media layer of the carotid arteries and significant correlation was found between the calcium content of the arterial wall and IMT measured on the identical arterial segments.*

➔ Results of the study comparing the atherosclerotic burden of the different arterial regions suggest that besides the IMT measurement of common carotid artery, which is frequently used as an early indicator of coronary disease, other vessels should also be considered as indicators of global atherosclerosis. *In our opinion, external carotid and femoral arteries are as or even more sensitive atherosclerosis markers than the common carotid artery.*

7. IRODALOM

7.1. Hivatkozások

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.

Adams HP Jr, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijdicks EF; Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2007;38:1655-711.

Adams MR, Nakagomi A, Keech A, Robinson J, McCredie R, Bailey BP, Freedman SB, Celermajer DS. Carotid intima-media thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease. *Circulation*. 1995;92:2127-2134.

Agewall S, Fagerberg B, Berglund G, Schmidt C, Wendelhag I, Wikstrand J. Risk Factor Intervention Study Group, Sweden. Multiple risk intervention trial in high risk hypertensive men: comparison of ultrasound intima-media thickness and clinical outcome during 6 years of follow-up. *J Intern Med*. 2001;249:305-314.

Airenne S, Surcel HM, Alakarppa H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, Laurila A. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun*. 1999;67:1445-1449.

Allison MA, Tiefenbrun J, Langer RD, Wright CM. Atherosclerotic calcification and intimal medial thickness of the carotid arteries. *Int J Cardiol*. 2005;103:98-104.

Apfalter P, Blasi F, Boman J, Gaydos CA, Kundi M, Maass M, Makristathis A, Meijer A, Nadrchal R, Persson K, Rotter ML, Tong CY, Stanek G, Hirschl AM. Multicenter

comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. *J Clin Microbiol.* 2001;39:519–524.

ARIC study group, Burke GL, Evans GW, Riley WA, Sharrett AR, Howard G, Barnes RW, Rosamond W, Crow RS, Rautaharju PM, Heiss GM. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke.* 1995;26:386-391.

Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med.* 1998;339:1415-25.

Bellido-Casado J, Martín-Escudero JC, Tasende-Mata J, Mena-Martín J, Simal-Blanco F, Ortiz de Lejarazu R. [Chlamydia pneumoniae seroprevalence in adults from the general population]. *Med Clin (Barc).* 2006;126:765-7.

Bloemenkamp DG, Mali WP, Visseren FL, van der GY. Meta-analysis of sero-epidemiologic studies of the relation between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does study design influence results? *Am Heart J.* 2003;145:409–417.

Bonita R, Stewart A, Beaglehole R. International trends in stroke mortality:1970-1985. *Stroke.* 1990;21:989-92.

Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet.* 1992;339:342-4.

Cerne A, Kranjec I. Atherosclerotic burden in coronary and peripheral arteries in patients with first clinical manifestation of coronary artery disease. *Heart Vessels.* 2002;16:217-226.

Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1885-1891.

Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997;96:1432-7.

Bots ML, Grobbee DE. Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002;16:341-51.

Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin*. 2006;22:2181-2190.

Brands PJ M, van de Poll, Quaedackers JA. Combined micro-PIXE and NIR Raman spectroscopic plaque characterisation in a human atherosclerotic aorta sample. *Nucl Instr Meth B*. 2001;181:454-459.

Brook RD, Bard RL, Patel S, Rubenfire M, Clarke NS, Kazerooni EA, Wakefield TW, Henke PK, Eagle KA. A negative carotid plaque area test is superior to other noninvasive atherosclerosis studies for reducing the likelihood of having underlying significant coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:656-662.

Cerne A, Kranjec I. Atherosclerotic burden in coronary and peripheral arteries in patients with first clinical manifestation of coronary artery disease. *Heart Vessels*. 2002;16:217-226.

Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ, Rosamond WD, Evans G. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol*. 2000;151:478-87.

Cirillo F, Renzulli A, Leonardo G. Associated vascular lesions in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Acta Cardiol*. 2001;56:91-96.

Cochrane M, Pospischil A, Walker P, Gibbs H, Timms P. Discordant detection of *Chlamydia pneumoniae* in patients with carotid artery disease using polymerase chain reaction, immunofluorescence microscopy and serological methods. *Pathology*. 2005;37:69-75.

Criqui MH, Langer RD, Fronek A. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med.* 1992;326:381–386.

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet.* 1997; 350:430–436.

Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: The Muscatine Study. *Circulation.* 2001;104:2815-9.

Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation.* 1995;92:2029-32.

Demer LL, Tintut Y. Osteopontin. Between a rock and a hard plaque. *Circ Res.* 1999;84:250-2.

Deneke T, Langner K, Grewe PH, Harrer E, Müller KM. Ossification in atherosclerotic carotid arteries. *Z Kardiol.* 2001;90Suppl 3:106-15.

Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, Rajavashisth TB. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J.* 2002;16:577-82.

Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:11201–11206.

Espeland MA, Evans GW, Wagenknecht LE, O'Leary DH, Zaccaro DJ, Crouse JR, Howard G, Haffner SM. Site-specific progression of carotid artery intimal-medial thickness. *Atherosclerosis.* 2003;171:137-143.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Peth S, Kopp H, Victor A, Hafner G, Meyer J. [Manifestations of atherosclerosis in various vascular regions. Similarities and differences regarding epidemiology, etiology and prognosis.] *Med Klin (Munich).* 2002;97:221-8.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Victor A, Hafner G, Prellwitz W, Schlumberger W, Meyer J. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2002;33:2581–2586.

European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25:457-507.

Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112:1018-31.

Glagov S, Vito R, Giddens DP, Zarins CK. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J Hypertens Suppl*. 1992;10:S101-4.

Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, Degra T, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL; American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; American Academy of Neurology. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*. 2006;37:1583-633.

Gongora-Rivera F, Labreuche J, Jaramillo A, Steg PG, Hauw JJ, Amarenco P. Autopsy Prevalence of Coronary Atherosclerosis in Patients With Fatal Stroke. *Stroke*. 2007;38:1203.

Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer U, Czlonkowska A. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12:235–239.

Gupta S, Leatham EW, Carrington D, et al. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 96:404–407.

Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, Thomas D; MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363:1491-502.

Higgins CL, Marvel SA, Morrisett JD. Quantification of calcification in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1567-76.

Howard G, Sharrett R, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, Burke GL. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke*. 1993;24:1297-1304

Hulthe J, Wikstrand J, Emanuelsson H, Wiklund O, de Feyter PJ, Wendelhag I. Atherosclerotic changes in the carotid artery bulb as measured by B-mode ultrasound are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:1189-1194.

Ieven MM, Hoymans VY. Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. *J Clin Microbiol*. 2005;43:19–24.

Janczak D, Skora J, Pupka A, Patrzalek D, Korta K, Pawlowski S, Rucinski A, Szyber P. [Presence of *Chlamydia pneumoniae* in the carotid artery.] *Pol Merkuriusz Lek*. 2004;16:513–515.

Johnsen SH, Mathiesen EB, Joakimsen O, Stensland E, Wilsgaard T, Løchen ML, Njølstad I, Arnesen E. Carotid atherosclerosis is a stronger predictor of myocardial infarction in women

than in men: a 6-year follow-up study of 6226 persons: the Tromso Study. *Stroke*. 2007;38:2873-80.

Kafetzakis A, Kochiadakis G, Laliotis A, Peteinarakis I, Touloupakis E, Igoumenidis N, Katsamouris A. Association of subclinical wall changes of carotid, femoral, and popliteal arteries with obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Chest*. 2005;128:2538-2543.

Kanters S, Algra A, Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements. *Stroke*. 1997;28:665-671.

Kastelein JJ, Sager PT, de Groot E, Veltri E. Comparison of ezetimibe plus simvastatin versus simvastatin monotherapy on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia. Design and rationale of the Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression (ENHANCE) trial. *Am Heart J*. 2005;149:234-9.

Kawarada O, Yokoi Y, Morioka N, Nakata S, Higashiue S, Mori T, Iwahashi M, Hatada A. Carotid stenosis and peripheral artery disease in Japanese patients with coronary artery disease undergoing coronary artery bypass grafting. *Circ J*. 2003;67:1003-1006.

Khoury Z, Schwartz R, Gottlieb S, Chenzbraun A, Stern S, Keren A. Relation of coronary artery disease to atherosclerotic disease in the aorta, carotid, and femoral arteries evaluated by ultrasound. *Am J Cardiol*. 1997;80:1429-1433.

Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, Muggeo M, Xu Q, Wick G, Poewe W, Willeit J. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 2001;103:1064–1070.

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*. 1985;5:293-302.

Lanzer P. Vascular multimorbidity in patients with a documented coronary artery disease. *Z Kardiol.* 2003;92:650–659.

LeGeros RZ. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. *Z Kardiol.* 2001;90 Suppl 3:116-24.

Lekakis JP, Papamichael CM, Cimponeriu AT, Stamatelopoulos KS, Papaioannou TG, Kanakakis J, Alevizaki MK, Papapanagiotou A, Kalofoutis AT, Stamatelopoulos SF. Atherosclerotic changes of extracoronary arteries are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *The Am J Cardiol.* 2000;85:949-52.

Lekakis JP, Papamichael C, Papaioannou TG, Stamatelopoulos KS, Cimponeriu A, Protogerou AD, Kanakakis J, Stamatelopoulos SF. Intima-media thickness score from carotid and femoral arteries predicts the extent of coronary artery disease: intima-media thickness and CAD. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2005;21:495-501.

Leowattana W, Mahanonda N, Bhuripanyo K, Pokum S. Seroprevalence of Chlamydia pneumoniae infection in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2000;83 Suppl 2:S1-5.

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247:349-58.

Long TH, Criqui MH, Vasilevskis EE, Denenberg JO, Klauber MR, Fronck A. The correlation between the severity of peripheral arterial disease and carotid occlusive disease. *Vas Med.* 1999;4:135-142.

Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke.* 2006;37:87-92.

Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology.* 1997;48:699–706.

Magyar MT. A gyulladás és az ateroszklerózis kapcsolata. *Metabolizmus.* 2003;1:67-72.

Magyar MT, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L, Bereczki D. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke*. 2003;34:58–63.

Magyar MT, Paragh G, Katona E, Valikovics A, Seres I, Csiba L, Bereczki D. Serum cholesterol has a more important role than triglycerides in determining intima-media thickness of the common carotid artery in subjects younger than 55 years of age. *J Ultrasound Med*. 2004;23:1161-9.

Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G, Xu Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and Cytomegalovirus with immune reactions to heatshock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation*. 2000;102:833–839.

Megnien JL, Simon A, Gariepy J, Denarie N, Cocaul M, Linhart A, Levenson J. Preclinical changes of extracoronary arterial structures as indicators of coronary atherosclerosis in men. *J Hypertens*. 1998;16:157-163.

Mercuri M, Bond MG, Sirtori CR, Veglia F, Crepaldi G, Feruglio FS, Descovich G, Ricci G, Rubba P, Mancini M, Gallus G, Bianchi G, D'Alò G, Ventura A. Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptomatic hypercholesterolemic mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *Am J Med*. 1996;101:627-34.

Miralles M, Merino J, Busto M, Perich X, Barranco C, Vidal-Barraquer F. Quantification and characterization of carotid calcium with multi-detector CT-angiography. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;32:561-567.

Nagy Zoltán. Vascularis Neurológia, Budapest, B+V kiadó, 2006; pp. 22-29.

Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Phillips CD, Kramer CM. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *Am J Roentgenol*. 2005;184:295-8.

Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Finch M, Phillips CD, Bollampally SR, Kramer CM. Carotid artery calcification on CT may independently predict stroke risk. *Am J Roentgenol*. 2006;186:547-52.

Nencini P, Sarti C, Innocenti R, Pracucci G, Inzitari D. Acute inflammatory events and ischemic stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 2003;15:215-221.

Nicolaides AN, Kakkos SK, Griffin M, Sabetai M, Dhanjil S, Thomas DJ, Geroulakos G, Georgiou N, Francis S, Ioannidou E, Doré CJ; Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Stroke (ACSRS) Study Group. Effect of image normalization on carotid plaque classification and the risk of ipsilateral hemispheric ischemic events: results from the asymptomatic carotid stenosis and risk of stroke study. *Vascular*. 2005;13:211-21.

Nogueira GV, Silveira L, Martin AA, Zângaro RA, Pacheco MT, Chavantes MC, Pasqualucci CA. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. *J Biomed Opt*. 2005;10:031117.

O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999;340:14-22.

Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol*. 2001;90Suppl 3:27-30.

Pasierski T, Sosnowski C, Szulczyk A, Leszczynski L, Rewicki M. [The role of ultrasonography of the peripheral arteries in diagnosing coronary artery disease.] *Pol Arch Med Wewn*. 2004;111:21-25.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hillen B, Banga JD, Haudenschild CC, Borst C. Is plaque formation in the common carotid artery representative for plaque formation and luminal

stenosis in other atherosclerotic peripheral arteries? A post mortem study. *Atherosclerosis*. 1998;137:205-210.

Páll D, Settakis G, Katona E, Csiba L, Kakuk G, Limburg M, Bereczki D, Fülesdi B. Debrecen Hypertension Study. Increased common carotid artery intima-media-thickness in adolescent hypertension: results from the Debrecen Hypertension study. *Cerebrovasc Dis*. 2003;15:167-72.

Rajta I, Borbély-Kiss I, Móri G. The new ATOMKI scanning proton microprobe. *Nucl Instrum Meth B* 1996;109-110:148-153.

Salonen R, Salonen JT. Progression of carotid atherosclerosis and its determinants: a population-based ultrasonography study. *Atherosclerosis*. 1990;81:33-40.

Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:1245-1249.

Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation*. 1993;87(suppl II):56-65.

Schulte-Altdorneburg G, Droste DW, Felszeghy S, Kellermann M, Popa V, Hegedüs K, Hegedüs C, Schmid M, Módos L, Ringelstein EB, Csiba L. Accuracy of in vivo carotid B-mode ultrasound compared with pathological analysis (Intima media thickening, lumen diameter and cross-sectional area). *Stroke* 2001;32:1520-1524.

Simon A, Gariepy J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens*. 2002;20:159-69.

Sitzer M, Puac D, Buehler A, Steckel DA, von Kegler S, Markus HS, Steinmetz H. Internal carotid artery angle of origin: a novel risk factor for early carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2003;34:950-5.

Smedby O, Nilsson S, Bergstrand L. Development of femoral atherosclerosis in relation to flow disturbances. *J Biomech*. 1996;29:543-547.

Smedby O. Geometrical risk factors for atherosclerosis in the femoral artery: a longitudinal angiographic study. *Ann Biomed Eng.* 1998;26:391-397.

Spence JD. Ultrasound measurement of carotid plaque as a surrogate outcome for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2002;89:10B-15B

Szabó Gy, Borbély-Kiss I. PIXEKLM computer package for PIXE analyses. *Nucl Instrum Meth B.* 1993;75:123-126.

Thomas M, Wong Y, Thomas D, Ajaz M, Tsang V, Gallagher PJ, Ward ME. Relation between direct detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity (Stary grading) of associated atherosclerotic plaque. *Circulation.* 1999; 99:2733–2736.

Tohno S, Tohno Y. Age-related differences in calcium accumulation in human arteries. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand).* 1998;44:1253-63.

Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Kownator S, Prati P, Rundek T, Taylor A, Bornstein N, Csiba L, Vicaute E, Woo KS, Zannad F; Advisory Board of the 3rd Watching the Risk Symposium 2004, 13th European Stroke Conference. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis.* 2004;18:346-9.

Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaute E, Woo KS, Zannad F, Zureik M. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis.* 2007;23:75-80

Touboul PJ, Vicaute E, Labreuche J, Belliard JP, Cohen S, Kownator S, Portal JJ, Pithois-Merli I, Amarenco P et al; on behalf of PARC study participating physicians. Correlation

between the Framingham risk score and intima media thickness: The Paroi Arterielle et Risque Cardio-vasculaire (PARC) study. *Atherosclerosis*. 2007;192:363-369.

Tsivgoulis G, Vemmos K, Papamichael C, Spengos K, Manios E, Stamatelopoulos K, Vassilopoulos D, Zakopoulos N. Common carotid artery intima-media thickness and the risk of stroke recurrence. *Stroke*. 2006;37:1913-6.

Uzonyi I, Rajta L, Bartha L, Kiss ÁZ, Nagy A. Realization of the simultaneous micro-PIXE analysis of heavy and light elements at a nuclear microprobe. *Nucl Instrum Meth B*. 2001;181:193-198.

Uzonyi I, Szabó Gy. PIXEKLIM-TPI – A software package for quantitative elemental imaging with nuclear microprobe. *Nucl Instrum Meth B*. 2005;231:156-161.

Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E686–E696.

Virok D, Kis Z, Karai L, Intzedy L, Burian K, Szabo A, Ivanyi B, Gonczol E: *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic middle cerebral artery. *Stroke*. 2001;32:1973–1976.

Watt F, Rajendran R, Ren MQ, Tan BKH, Halliwell B. A nuclear microscopy study of trace elements Ca, Fe, Zn and Cu in atherosclerosis. *Nucl Instr Meth B*. 2006;249:646-652.

Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1404-1411.

Widder B. *Doppler- und Duplexsonographie der hirnversorgenden Arterien*. 5. aktualisierte und erweiterte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.

Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, Gondo T, Nakazawa T, Ito H. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* infection in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke*. 1998; 29:773–778.

Zureik M, Ducimetière P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, Magne C. Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic

plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1622-9.

7.2. A szerző közleményei

1. **Molnár S**, Kerényi L, Ritter MA, Magyar MT, Ida Y, Szöllősi Z, Csiba L. Correlations between the atherosclerotic changes of femoral, carotid and coronary arteries A post mortem study. *J Neurol Sci.* 2009;287:241-5. **IF2008: 2,359**
2. Kónya J, **Molnár S**, Magyar MT, Szekeres CC, Kerényi L, Csiba L. Severity of carotid atherosclerosis unrelated to Chlamydia pneumoniae infection in acute ischemic stroke patients: a clinicopathological study. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25:170-175. **IF: 3,041**
3. Magyar MT, Szikszai Z, Kertész Z, **Molnár S**, Uzonyi I, Szíki GA, Csiba L. Calcium distribution in the vessel wall and intima-media thickness of the human carotid arteries. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:1171-8. **IF: 1,922**
4. Molnar MJ, Valikovics A, **Molnar S**, Tron L, Dioszeghy P, Mechler F, Gulyas B. Cerebral blood flow and glucose metabolism in mitochondrial disorders. *Neurology.* 2000;55:544-8. **IF: 4,781**
5. Csepány T, Boczan J, Magyar MT, **Molnar S**, Csiba L, Decsy J, Toth J, Felszeghy S, Szakall S, Szentkereszty Z, Bereczki D. Miller Fisher syndrome--a presenting clinical manifestation of lung cancer in a previously apparently healthy individual. *J Neurol.* 2004;251:898-900. **IF:3,14**
6. Kemény V, **Molnár S**, Andrejkovics M, Makai A, Csiba L. Acute and chronic effects of vinpocetine on cerebral hemodynamics and neuropsychological performance in multi-infarct patients. *J Clin Pharmacol.* 2005;45:1048-54. **IF:2,889**
7. Szikszai Z, Kertész Z, Uzonyi I, Szíki GA, Magyar MT, **Molnár S**, Ida Y, Csiba L. Regional calcium distribution and ultrasound images of the vessel wall in human carotid

- arteries. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 2005; 231:263-267. **IF: 1,181**
8. Rosengarten B, Paulsen S, **Molnar S**, Kaschel R, Gallhofer B, Kaps M. Acetylcholine esterase inhibitor donepezil improves dynamic cerebrovascular regulation in Alzheimer patients. *J Neurol*. 2006;253:58-64. **IF: 2,984**
 9. Rosengarten B, **Molnar S**, Trautmann J, Kaps M. Simultaneous VEP and transcranial Doppler ultrasound recordings to investigate activation-flow coupling in humans. *Ultrasound Med Biol*. 2006;32:1171-80. **IF: 2,011**
 10. Rosengarten B, Paulsen S, **Molnar S**, Kaschel R, Gallhofer B, Kaps M. Activation-flow coupling differentiates between vascular and Alzheimer type of dementia. *J Neurol Sci*. 2007;257:149-54. **IF: 2,315**
 11. Oláh L, Raiter Y, Candale C, **Molnár S**, Rosengarten B, Bornstein NM, Csiba L. Visually evoked cerebral vasomotor response in smoking and nonsmoking young adults, investigated by functional transcranial Doppler. *Nicotine Tob Res*. 2008;10:353-8. **IF: 2,539**
 12. **Molnár S**, Csiba L. Magyar stroke-betegek vaszkuláris rizikófaktorainak alakulása 1 éves követés során. *Háziorvos továbbképző szemle*. 2008;13:118–123

8. TÁRGYSZAVAK

magyarul: Chlamydia pneumoniae, Carotis, Coronaria, Femoralis, Intima-media vastagság, kalcifikáció, Részecske indukált röntgenemisszió, Ischaemás stroke, Atherosclerosis

angolul: Chlamydia pneumoniae, Carotid arteries, Coronary arteries, Femoral arteries, Intima-media thickness, Calcification, Particle induced X-ray emission, Ischemic stroke, Atherosclerosis

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Csiba László professzor úrnak, hogy elindított a kutatómunka útján. Munkámat mindig támogatta, megteremtette a szükséges tárgyi és finansziális feltételeket, az intézetek közötti kapcsolatokat. Tapasztalataival segített áthidalni a felmerülő nehézségeket.

Hálás vagyok Magyar Mária Tünde adjunktusnőnek, a vizsgálatokban társszerzőkét végzett áldozatos munkájáért, a statisztikai elemzésben, az eredmények értékelésében nyújtott segítségéért, melyben saját tapasztalatai nagyban hozzájárultak a munkák sikeréhez.

Köszönöm Kónya József tanár úrnak a *Chlamydia pneumoniae*-vel kapcsolatos laboratóriumi vizsgálatok elvégzését, precíz kiértékelését, a közös eredmények közleményben történő összefoglalását.

Köszönettel tartozom kedves kollégámnak és barátomnak Kerényi Levente főorvos úrnak az érszeletek paramétereinek igen fáradságos és idegőrlő lemérésében végzett kitartó munkájáért.

Köszönöm Bereczki Dániel professzor úr szemléletemet formáló hasznos tanácsait, bátorítását.

A társintézetekből Gomba Szabolcs Professzor Úrnak, Szöllősi Zoltán, Martin Andreas Ritter, Yaeko Ida és Szekeres Csilla orvoskollégáknak, továbbá Szikszai Zita fizikus kolléganőnek tartozom köszönettel.

A vizsgálati terv kidolgozásában nyújtott segítségéért és a kiegészítő statisztikai vizsgálatokért Kardos László orvos- statisztikus kollégának mondok ezúton köszönetet.

A technikai segítséget Borók Józsefné Ildikónak és Nagy Katalinnak hálásan köszönöm.

Végül köszönöm családomnak, hogy sokszor nélkülöztek, ennek ellenére mindig mellettem álltak és támogattak.

10. FÜGGELÉK