

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**NEUROPATHOLÓGIAI VIZSGÁLATOK CEREBROVASCULARIS  
KÓRKÉPEKBEN**

**SEJTHALÁL MECHANIZMUSOK ÉS HAEMORRHAGIÁS  
TRANSZFORMÁCIÓ ISCHAEMIÁS STROKE-BAN, PROGNOZTIKUS  
FAKTOROK ÁLLOMÁNYVÉRZÉSEKBEN**

Dr. Szepesi Rita

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor



DEBRECENI EGYETEM  
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2016

**NEUROPATHOLÓGIAI VIZSGÁLATOK CEREBROVASCULARIS  
KÓRKÉPEKBEN**

**SEJTHALÁL MECHANIZMUSOK ÉS HAEMORRHAGIÁS  
TRANSZFORMÁCIÓ ISCHAEMIÁS STROKE-BAN, PROGNOZTIKUS  
FAKTOROK ÁLLOMÁNYVÉRZÉSEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szepesi Rita, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora  
tagok: Dr. Diószeghy Péter, PhD  
Dr. Valikovics Attila, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: DE ÁOK Neurológiai Tanszék 312.  
oktatóterme, 2016.06.09. 11 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Kovács Tibor, PhD  
Dr. Szabó Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, az MTA doktora  
tagok: Dr. Diószeghy Péter, PhD  
Dr. Kovács Tibor, PhD  
Dr. Szabó Sándor, PhD  
Dr. Valikovics Attila, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet "A"  
épület tanterme, 2016.06.09. 13 óra

## 1. BEVEZETÉS

A klinikai boncolások gyakorisága évtizedek óta drasztikusan hanyatlik, noha ezek továbbra is fontos visszajelzést jelentenek a klinikai gyakorlatban. A halál okának tisztázása mellett, mely nem csupán individuális esetekben fontos, hanem az epidemiológiai statisztikák alapját is képezi, a betegségek váratlan komplikációinak (pl. a terápiák nem várt mellékhatásainak) felderítését is a boncolástól várhatjuk. A klinikopathológiai tanulmányok nagy jelentőségűek, mert a halotti bizonyítványokban és a kórházi zárójelentésekben szereplő klinikai diagnózisok a post-mortem pathológiai vizsgálatkor kapott diagnózisokkal összehasonlítva gyakorta jelentős eltéréseket mutatnak. Emellett nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a medikusok színvonalas pre- és posztgraduális képzése során is.

Intézetünk mintegy 500 000 lakos ellátásáért felelős stroke centrum, ahol évente kb. 800 acut stroke beteget kezelünk. A thrombolysissal kezelt betegek aránya a nyugat-európai országokhoz képest 19%-kal magasabb. A mindennapi gyakorlat során számos képalkotó eljárásra (CT, MRI) támaszkodunk, melyek az agy számos morfológiai elváltozásáról nyújtanak hasznos információt. Bár felvételtkor számos betegünkről, a stroke betegeink közül pedig mindahányról (és ha a romló neurológiai status megkívánja, a későbbiekben is) készül koponya CT vagy MRI vizsgálat, sem etikai, sem pénzügyi korlátok nem teszik lehetővé a képalkotó vizsgálatok napi gyakoriságú, rutinszerű alkalmazását azon célból, hogy a terminális állapotú betegeknél a klinikai állapot hanyatlásának okát vagy a halál okát minden esetben már premortem tisztázhassuk. Az elmúlt években a Debreceni Egyetem Neurológia Klinikáján elhunyt betegek több mint 90%-ának boncolása történt a Pathológia Intézetben, majd a Neuropathológia Laboratóriumában, mely egy különleges lehetőség a hanyatló arányú autopsziák időszakában.

Az agyi ischaemiás elváltozások vizsgálata egyre nagyobb érdeklődésre tart számot. Ennek természetesen a legfőbb oka az lehet, hogy a cerebrovascularis kórképek a leggyakoribb idegrendszert érintő kórképek, becslések szerint 2010-ben a világon

11.57 millió ischaemiás stroke eset történt. Az ischaemiás stroke 1/3-a halállal végződik, a túlélő betegek között pedig magas a rokkantság aránya.

A vérzéses transzformáció az ischaemiás stroke gyakori komplikációja, habár a haemorrhagiás transzformációk (HT) jelentős részét nem kíséri a klinikai állapot rosszabbodása. A betegség kimenetelére vonatkozó hatása is kérdéses, a tanulmányok jó része főként az ischaemiás stroke-ban alkalmazott thrombolysis esetén vizsgálja a kérdést, elsősorban abból adódóan, hogy a HT a thrombolysis és az anticoaguláns terápia egyik gyakori mellékhatása. Számos korábbi tanulmány elemzi a különböző aetiológiai faktorok potenciális szerepét: kor, systolés és diastolés arteriás vérnyomás, pangásos szívelégtelenség, testhőmérséklet, vércukorszint, anticoaguláns kezelés, megelőző aszpirinkezelés, korai ischaemiás jelek a CT-n, az infarcerált terület térfogata, plasma mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) szint. A vérzéses transzformáció detektálására legalkalmasabb idő is vitatott, így összességében az autopsiás vizsgálatoktól várható a HT-k gyakoriságát illetően a legbiztosabb információ.

Az ischaemiás stroke molekuláris mechanizmusait vizsgálva számos neuroprotektív szer hatékonynak bizonyult állatkísérletes modellekben, melyek aztán nem igazolódtak az ischaemiás stroke humán klinikai vizsgálataiban. Ennek feltehetően az állhat a háttérben, hogy azok a molekuláris mechanizmusok, melyek a humán agyi ischaemiában lejátszódnak, másfajta koreográfia szerint zajlanak az állatkísérletek kontrollált körülményei között, mely utóbbiak általában fiatal, társbetegségekkel nem rendelkező egyedek vagy egy adott betegségre genetikusan determinált fajták (pl. spontán hipertenziós patkányok) részvételével történnek. Nyilvánvalóan egészen más körülmények uralkodnak egy idős stroke beteg szervezetében, akinek a stroke kialakulásának pillanatában egyéb cardiovascularis vagy pulmonológiai megbetegedése is van.

Irodalmi adatok szerint ischaemiás stroke-ban az apoptoticus sejthalál a sejtek kisebb hányadát érinti, mint a necrosis, mégis dominál a jelenléte a penumbrában, mely a neuroprotektív próbálkozások fő targetje. Az arteria cerebri media (ACM) elzáródás során aktiválódó extrinsic és intrinsic apoptosis útvonalak vizsgálatával patkányokban és egerekben számos tanulmány foglalkozott korábban. A humán agyi ischaemia

sejthalál mechanizmusainak folyamatáról azonban mindössze néhány tanulmány szólott eddig, a neuronok mitokondrium-függő apoptózisának pontos szerepe sem ismert a humán mintákban. Még kevesebb olyan munka áll rendelkezésre, ahol a stroke-ot követő rövid túlélési idő a korai folyamatok vizsgálatát is lehetővé teszi. Kísérletes állatmodellek alapján a poly(ADP-ribosyl)atio gátlását neuroprotektív hatásúnak gondolták. Klinikai vizsgálatokban (I. és II. fázisú) a PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase) gátlás kardioprotektív hatásúnak, valamint adjuváns kezelésként chemo- és radiosensitizer hatásúnak bizonyult. Ischaemiás stroke-ban eddig a PARP-1 inhibíciót nem vizsgálták (pl. [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)), mégis a stroke tűnik a PARP-1 inhibitor alkalmazás egyik legígéretesebb területének.

A spontán kialakuló agyállomány vérzések világszerte 5 millió embert érintenek évente, incidenciájuk évi 10-30/100 000 lakosra tehető, az összes stroke esemény 10-15%-át képviselik. Az összes stroke altípuson belül az egyik legnagyobb mortalitású kórképek, 40%-os a 30 napos halálozási arányuk, a fatális kimenetel 50%-a az állományvérzés kialakulását követő két napban történik. A haemorrhagiás stroke-ot túlélők között magas a rokkantság aránya, 6 hónappal később mindössze 20%-ban képesek az önálló életre. A gyógyszeres és sebészi kezelési lehetőségek alul maradnak az ischaemiás stroke-ban rendelkezésre álló lehetőségekhez képest. Miután a vérzés által okozott primer agykárosodás mérséklésére egyelőre nem ismert bizonyítottan hatékony eljárás, az állományvérzések kezelése elsősorban a másodlagos károsodások megelőzésére fókuszál. Az intracerebralis vérzések (ICH) lehetőség szerinti legmegbízhatóbb prognosztizálása nagyon fontos, mert a kórkép magas mortalitása ellenére sem elfogadható a fatalista, eleve lemondó megközelítés, mely mind a szélesebb körben vett ellátó személyzetet, mind a családtagokat érintheti. A prognosztizálásban segítő eszközök támpontot nyújtanak a klinikusoknak a várható kimenetelre vonatkozó objektív vélemény kialakításában, ugyanakkor segítséget nyújthatnak a bizonyítékokon alapuló életvégi döntések (újraélesztés, kezeléskorlátozás) meghozatalában is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

I. A Debreceni Egyetem Neuropathológiai Laboratóriumában a 2 évig tartó vizsgálati periódusban boncolt esetek klinikai és boncolási adatait retrospektív módon elemezve célunk az volt, hogy

- 1) vizsgáljuk az agyi ischaemiás infarctus eseteiben a klinikai, valamint a neuropathológiai eszközökkel felállítható diagnózisok megfelelésének mértékét,
- 2) elemezzük, hogy a neuropathológiai vizsgálat milyen új adattal szolgálhat és ennek kapcsán meghatározzuk, milyen elváltozások kerülnek gyakran csak post-mortem azonosításra,
- 3) kritikusan vizsgáljuk a neuropathológiai értékelés jelentőségét a rutin képalkotó diagnosztika eredményeivel összevetve.

II. A Helsinki Egyetem Központi Kórházának Neurológia Intézetében kezelt tizenhárom ischaemiás stroke miatt elhunyt beteg agyának vizsgálatával célunk az volt, hogy

- 1) immunhisztokémiai és immunfluoreszcencián alapuló módszerekkel (kaspáz-3, PARP-1, p89 fragmentum, PAR, TUNEL) megpróbáljuk jellemezni az ischaemiás stroke-ban lezajló különböző sejthalál mechanizmusokat (necrosis, apoptosis) egyrészt a stroke kialakulása óta eltelt idő, másrészt a stroke lokalizációjának (mag, periinfarctusos régió, contralateralis félteke) függvényében.

III. A Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikáján az 53 hónapig tartó vizsgálati periódusban primer agyi állományvérzés miatt kezelt betegek klinikai adatainak retrospektív módon történő elemzésével, valamint a betegekről készült koponya CT felvételek alapján történt klasszikus, képalkotó alapú, a formalin fixált agyakon pedig post-mortem elvégzett volumetriás mérések kombinálásával célunk az volt, hogy

- 1) a nem-túlélő csoportban a kiindulási CT eredményeit az ABC/2 módszerrel megszerezhető volumetriás végponttal összehasonlítva a haematoma növekedés indexét az elhunyt betegekben is meghatározhatjuk,
- 2, kifejlesszünk egy új, relative egyszerű, klinikai és epidemiológiai adatokra támaszkodó, reprodukálható és költséghatékony értékelő rendszert, mely alkalmas arra, hogy segítségével megbecsüljük a 30 napos halálos kimenetel rizikóját.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. A klinikai és neuropathológiai diagnózisok összehasonlító elemzése**

##### **3.1.1. Betegválogatás és adatgyűjtés**

Retrospektív módon elemeztük a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Neuropathológiai Laboratóriumában 2011. január és 2012. december között boncolt eseteket. Az összes vizsgált beteget a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikáján kezelték, közülük a stroke betegek mindegyikét multiparametriás monitorozásra alkalmas stroke osztályon. A vizsgált populációban minden beteg idősebb volt, mint 18 éves, az átlagéletkor 62.66 év (SD 6.51) volt. Az alábbi adatokat gyűjtöttük össze a zárójelentésekre támaszkodva: nem, életkor, túlélési idő a stroke-ot követően, thrombocyta-aggregációt gátló gyógyszer vagy anticoaguláns gyógyszer szedése a kezelés során, stroke betegeknél a felvételkor rögzített NIHSS, a kezelés során készített koponya CT, CTA és MRI vizsgálatok eredményei, valamint az általános boncolás eredményei. Klinikailag ischaemiás stroke diagnózist kaptak azok a betegek, akiknek acut kezdetű focalis neurológiai tünetei voltak azzal egyidejűleg, hogy a képalkotó diagnosztikai eljárással akár infarctusnak megfelelő kép látszott, akár egyáltalán nem volt ischaemiás jel. Haemorrhagiás stroke volt a klinikai diagnózis, ha a focalis neurológiai tünetek mellett a felvételkor készült koponya CT-n intraparenchymalis vérzésre utaló hyperdensitas látszott.

Primer intracerebralis tumor volt a klinikai diagnózis, ha a betegnek korábban szövettanilag vagy képalkotó vizsgálattal igazolt központi idegrendszeri daganata volt. Ezekben az esetekben a felvétel okaként általában a betegség progressziója szerepelt (pl. mélyülő tudatzavar, nyelészavar vagy epilepsziás roszullét). Az agyi metastasisok eseteiben képalkotó vizsgálatok igazolták a központi idegrendszeri áttéteket, a beteg neurológiai osztályra történő felvételét a betegség progressziója (magnövekedett intracranialis nyomás, epilepsziás roszullét) vagy acut stroke tette szükségessé, a primer tumort pedig már klinikailag diagnosztizálták, hisztológiai szempontból verifikálták.

A központi idegrendszer fertőzéseinek eseteiben a neurológiai tünetek, a meningealis izgalmi jelek felvetették meningitis vagy meningo-encephalitis lehetőségét, melyet a liquor vizsgálata megerősített: az infectív ágenstől függően normális vagy csökkent liquor cukorszint mellett a sejtszám és a fehérjetartalom emelkedett volt.

### **3.1.2. Neuropathológiai értékelés**

Neuropathológiai Laboratóriumunkban a standard protokollnak megfelelően az eltávolított agyakat 10%-os formalinban fixáltuk, megelőzve a jelentősebb deformációt. Rutinszerűen mértük a formalin fixált teljes agy és külön a formalin fixált agytörzs-cerebellum komplexum tömegét is, mely által kiszámítható a supra- és infratentorialis részek tömegének hányada, információt nyújtva ezzel az atrophia arányairól vagy az agy tömegének növekedéséről, pl. oedema miatt. Részletes külleírást követően 0.75 cm vastagságú coronalis szeleteket készítettünk. Ez a vastagság megfelelő ahhoz, hogy az állományban látható kisebb, de makroszkópos méretű focalis eltérések is metszési síkba kerüljenek és diagnosztizálhatóak legyenek (állományvérzés, infarctus, vérzéses transzformáció, beékelődés, másodlagos agytörzsi vérzés, arachnoidealis cysta, tumor vagy metastasis, stb.). A korongok makroszkópos értékelését követően kb. 2x2x0.5 cm méretű (neuropathológiai értékelésre rutinszerűen alkalmazott kazettákba illeszkedő) szövetmintákat vágunk ki a BrainNet Europe ajánlása szerinti lokalizációkban (frontalis cortex, temporalis cortex, gyrus cinguli, parietalis cortex, gyrus prae- és postcentralis, occipitalis cortex, hippocampus anterior, hippocampus posterior, basalis előagy, striatum, thalamus, mesencephalon, pons, medulla, vermis, cerebellum). A blokkok paraffinos beágyazását követően 7 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket haematoxylin és eosin (H&E), valamint luxol fast blue és Nissl (LFB/Nissl) festésekkel kezelünk a rutin pathológiai értékeléshez. Az értékelést a minta lokalizációjának és a beteg kórtörténetének ismeretében neuropathológus szakorvos végezte. Tanulmányunkban a rutinszerűen végzett, mindennapi neuropathológiai gyakorlatban megszerezhető eredményeket értékeltük a klinikai diagnózisokkal összehasonlítva.



## **3.2. Sejthalál mechanizmusok ischaemiás stroke-ban**

### **3.2.1. Betegválogatás és adatgyűjtés**

Tizenhárom ischaemiás stroke-ban elhunyt beteg agyát vizsgáltunk. A betegeket a Helsinki Egyetem Központi Kórházának Neurológia Intézetében kezelték, 15-18 óra volt a stroke-ot követő átlagos túlélési és 18.6 óra (3.5–40 h) volt az átlagos postmortem idő. Kontrollként két nem-neurológiai ok miatt meghalt beteget választottunk. A protokollt a Helsinki Egyetem Központi Kórházának Etikai Bizottsága elfogadta, a hozzátartozók beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

### **3.2.2. Neuropathológiai értékelés**

A szövettani mintavétel a legutolsó koponya CT eredménye alapján, egyrészt az infarctus magból, másrészt a feltételezett penumbra területéről, a contralateralis hemisphaerium identikus területeiről, valamint két kontroll agyból történt. Boncolás során az infarcterált terület makroszkópos kiválasztása után kb. 1 cm<sup>3</sup>-es, subcorticalis fehérállományt is tartalmazó corticalis mintát távolítottunk el, melyet aztán formalinban fixáltunk, ezt követően pedig paraffinba ágyaztunk. A paraffinba ágyazott blokkokból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket haematoxylin-eosinnal festettünk, hogy az ischaemiás neuronális változásokat detektálhassuk. Az értékelést tapasztalt neuropathológus végezte a beteg kórtörténetének és a minta lokalizációjának ismerete nélkül. A látott neuronális ischaemiás elváltozás, valamint a sejtmag integritása alapján minden szövetmintát osztályozott: 0 pont: normál neuronális morfológia; 1 pont: döntően normál morfológia, de néhány neuron sejtmagjában már látszik eltérés (pyknosis, alacsony sejtmag-cytoplasma kontraszt, sejtmag határának elmosódása); 2 pont: sejtmag eltérésekkel rendelkező neuronok nagy számban; 3 pont: sejtmag eltérésekkel rendelkező neuronok nagy számban, valamint néhány irreverzibilis elváltozást mutató neuron zsugorodott cytoplasmával és szabálytalan sejthatárral vagy láthatatlan nucleusszal; 4 pont: irreverzibilis elváltozásokat mutató neuronok nagy számban.

A neuropathológiai besorolást a CT leletekkel és a makroszkópos boncolási képpel összehasonlítva, 0 és 1 pontszámú területeket a contralateralis féltekék mintái, valamint

a kontroll minták (ipsi- vagy contralateralis) tartalmaztak, míg a 3 pontszám elsősorban a periinfarctusos területeken, 4 pontszám pedig az infarctus magjában fordult elő.

### 3.2.3. Immunohisztokémia

Az alábbi antitesteket használtuk a vizsgálatok során: (1) monoclonalis nyúl hasított kaszpáz-3 elleni antitest (At), (2) monoclonalis poly(ADP-ribose)polymerase elleni At a teljes hosszúságú PARP-1 ellen, (3) egér immunoglobulin G1 az 2. At kontrolljaként, (4) polyclonalis nyúl PARP-1 p85 fragment elleni At (hasított PARP-1 elleni At), (5) nyúl immunoglobulin G a 4. At kontrolljaként, (6) monoclonalis anti-PAR At, (7) egér immunoglobulin G3 a 6. At kontrolljaként.

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákat xylenel deparaffináltuk, majd leszálló alkoholsorral rehidráltuk. Az antigén feltáráshoz 0.1M citrát puffert (PH 6.0) és mikrohullámú sütőt (két alkalommal 750W teljesíménnyel 5-5 percig, majd egy alkalommal 650W teljesítménnyel 10 percig) használtunk. Ezt követően 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és metanol (az ACA-3 antitest esetében 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és víz) keverékében hűtöttük 10 percig, majd 30 percig 10%-os normál serummal (az ACA-3 antitest esetén egy órán át 5% normál serummal) blokkoltuk. A primer antitesttel egy éjszakán át +4 °C-on történt az inkubáció, majd a biotinilált másodlagos ellenanyagot (1:200; 30 min) az avidin-biotin komplex 30 perces inkubációja követte. A diaminobenzidinnel (DAB) történő inkubáció a gyártó cég utasítása alapján, majd a sejtmagi kontrasztfestés Mayer-féle hemalum festéssel történt. A hasított PARP-1 (p85) kimutatására NovoLink™ detektálást alkalmaztunk szintén a gyártó cég javaslata alapján, a felhasznált puffert kivéve (0.05 M Tris-Hcl pH 7.6, 0.03 M NaCl, 0.1% Tween 20). További kontrollvizsgálatokat végeztünk az elsődleges, valamint a másodlagos antitest kihagyásával, ezeknél az eseteknél nem volt immunreakció. A PARP-1 és a hasított PARP-1 kimutatására Western blot analízist is végeztünk. Az ACA-3 antitestet a kaszpáz-3 proteinnel inkubálva (1 h, szobahő) az immunoreaktivitás sikeres kiküszöbölése megtörtént, igazolva az ACA-3 antitest specificitását.

### 3.2.4. Western blot vizsgálat

A Western blot analízis a PARP-1 antitestek specificitásának vizsgálatára szolgált (Serotec és Promega) elkülönítve egymástól a teljes hosszúságú és a hasított PARP-1-t. A teljes hosszúságú humán PARP-1 protein hasítására in vitro humán rekombináns kaszpáz-3 proteint használtunk. A reakcióhoz 750 ng tisztított ACA-3-t és 10 U teljes hosszúságú humán PARP-ot kevertünk össze, majd a keveréket 30 percig +37 °C-on inkubáltuk. Sávonként 400 ng mennyiséget a keverékből 8%-os SDS-poliakrilamid géltre, majd a gélfuttatást követően a fehérjéket PVDF membránra vittük. Az elsődleges antitest a PARP-1 esetén teljes hosszúságú PARP-1 ellenes antitest (Serotec Ab; 1:1000 hígítás), a hasított PARP-1 esetén pedig a Promega által gyártott hasított PARP-1 ellenes antitest (1:1000) volt. Tormagyökér-peroxidáz (HRP) konjugált kecske anti-egér és anti-nyúl IgG-t (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtunk másodlagos antitestként. A fehérje sávokat ECL Plus és Typhoon 9400 Variable Mode Imager segítségével vizualizáltuk. A negatív kontrollhoz az elsődleges antitestet kihagytuk a protokollból, ekkor immunreaktív sáv nem jelent meg.

### 3.2.5. Kettős jelölésű immunfluoreszcens festés (PARP-1, PAR)

Az antitesteket az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt hígításban alkalmaztuk. A paraffinba ágyazott metszeteket előbb xylennel deparaffináltuk, majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk. Az antigének feltárására mikrohullámú sütőt használtunk (0.1 M citrát puffer, pH 6.0; egy alkalommal 5 min 750 W, majd két alkalommal 5 min 650 W), ezt követően 0.1 M Tris-HCl/3% BSA (szarvasmarha serum albumin) és 20% FBS (foetalis szarvasmarha serum), pH 7.5 inkubáció történt 30 percig. Előbb a primer antitesttel inkubáltuk a metszeteket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd nyúlból származó egér-ellenes FITC-et (fluoreszcein-izotiocianát) használtunk 1:20 hígításban egy órán keresztül szobahőmérsékleten. Az endogén biotin blokkolás a gyártó cég javaslata alapján történt a második antitesttel történő egész éjszakás +4 fokalos inkubációt megelőzően. Egér-ellenes vagy nyúl-ellenes biotinilált másodlagos antitest használatát követően (1:200) NeutrAvidin Rhodamine Red-et használtunk 1:200 30

percig szobahőmérsékleten. A metszeteket Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) fluoreszcens fedőanyaggal fedtük. A metszeteket minden lépés között 2x5 percig PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat) mostuk. Minden lépés sötét nedves kamrában történt.

### **3.2.6. Hármas jelölésű immunfluoreszcens festés in situ sejthalál detektálásra TUNEL módszerrel ACA-3 és DAPI alkalmazásával**

Mikrohullámú kezelést követően (0.1 M citrát pufferben, pH 6.0, 370 W, 5 perc) 3%-os BSA-val 30 percig blokkoltuk a mintát (20% normál szarvasmarha serum/0.1 MTris–HCl, pH 7.5). Az éjszakán át történő primer antitesttel (ACA-3) történő inkubálást követően 30 percig 1:200 hígításban a második antitesttel inkubáltuk a mintát, majd RhodamineRed®-konjugált Neutralite™ avidint használtunk detektorként 1:200 hígításban 30 percig. Ezt követően végeztük el a TUNEL reakciót (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) a gyártó utasításai szerint (in situ cell death detection kit, Fluorescein; Boehringer Mannheim) FITC-tag-gel. A TUNEL reakció az apoptosusra jellemző DNS fragmentáció detektálására alkalmas módszer. A metszeteket Vectashield-DAPI fluoreszcens jelölő anyaggal fedtük, majd epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.2.7. A mikroszkópos eredmények értékelése, statisztikai analízis**

Az infarctus magból, a periinfarctusos régióból, valamint a contralateralis hemisphaerium identikus területeiről származó minták mikroszkópos eredményeit regisztráltuk. Minden metszetben öt egymást követő látótérben (0.3125 mm<sup>2</sup>) észlelhető immunreaktivitás értékelése történt az immunpozitív sejtek átlagának megadásával (átlag (SE) /mm<sup>2</sup>).

Noha van egyéb sejtek, pl. az astrocyták apoptosására is kísérletes bizonyíték, egybehangzóan a tartós ACM occlusiót vizsgáló állatkísérletes modellek eredményeivel, humán agyi ischaemiában az apoptoticus sejthalál és a TUNEL jelölődés legkifejezettebben a neuronokban érhető tetten. A jelenlegi tanulmányban bizonyos

sejthalál mediátorok, nevezetesen a PARP-1, p89 fragmentum, PAR, ACA-3 immunreaktivitás neuronokban látható értékelésére koncentráltunk.

Az ischaemiás neuronális elváltozásokat a szomszédos metszetből a Neuropathológiai részben (3.2.2.) már részletezett 0-4 skálán értékeltük. Az adatokat átlag és annak standard hibája formájában adtuk meg. A statisztikai analízis során a már korábban leírtakat követtük, SPSS for Windows programot (version 13.0) használtunk. Két agyi régió közötti különbséget immunreaktivitás tekintetében (immunoreaktív sejtsztruktúra/mm<sup>2</sup>) one-way ANOVA módszerrel hasonlítottunk össze, melyet LSD post hoc teszt követett. Jonckheere–Terpstra trend tesztet használtunk a folytonos változók közötti összefüggések elemzésére, pl. ACA-3 és PARP immunreaktivitás, ischaemiás neuronális károsodások szerinti osztályozás. Spearman korrelációs koefficiens (*r**S*) használtunk a PARP-1 és a TUNEL pozitív neuronok összehasonlításakor. Dobozdiagramos ábrázolással az oszlopon belüli vonallal a mediánt, az oszlopokkal a felső és az alsó kvartilist, a függőleges vonalakkal a nem extrém terjedelmet, a pontokkal pedig az extrém értékeket tüntettük fel. A *p*<0.05 értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

### **3.3. A 30 napos kimenetel vizsgálata spontán, supratentorialis lokalizációjú intracerebralis vérzésekben**

#### **3.3.1. Betegválogatás és adatgyűjtés**

Retrospektív módon elemeztük 156 beteg adatait, akiket egy 53 hónapig tartó vizsgálati periódus alatt kezeltek a Debreceni Egyetem Neurológia Klinikájának Intenzív Osztályán állományvérzés miatt (85 túlélő és 71 elhunyt). Minden beteg a stroke kezdetétől (vagy ennek bizonytalansága esetén az utolsó jó általános állapotban látott pillanattól) számítva 24 órán belül felvételre került az intenzív osztályra, mely stroke ellátásra specializálódott multiparametriás monitorizálásra alkalmas osztály. Minden betegről felvételét követően 30 percen belül koponya CT vizsgálat készült, mely alapján az állományvérzés diagnosztizálható volt. Második, kontroll CT általában 10 nappal a felvételt követően vagy állapotromlás esetén készült. Vizsgálatunkból kizártuk azokat az

eseteket, ahol a vérzés hátterében trauma, subarachnoidealis vérzés, vascularis malformatio, tumor, ischaemiás infarctus vérzéssel transzformációja vagy thrombolysis követő bevérzése szerepelt, a vérzések közül az infratentorialis vagy a csak intraventricularis lokalizációjúakat, valamint azokat a betegeket, akiknél az állományvérzés miatt kamradrain behelyezése vagy egyéb idegsebészeti beavatkozás történt.

A betegeket és adataikat a Debreceni Stroke Adatbázisra támaszkodva gyűjtöttük ki a vizsgálati periódusból. A betegek klinikai dokumentációjából a következő adatok retrospektív gyűjtését végeztük: nem, életkor, aktuális dohányzás, jelentős alkohol fogyasztás, felvételi systolés, diastolés arteriális vérnyomás és pulzusszám. A laboratóriumi paraméterek közül az alábbiakat használtuk fel: az érkezéskor vett mintából származó serum nátrium-, kálium- és glükózszint, véresejsüllyedés, haemoglobin, fehérvérsejt- és thrombocytaszám, máj- és vesefunkciós paraméterek, hemosztázis paraméterek.

### **3.3.2. CT analízis**

A képanalízist a Debreceni Egyetem Orvosi Laboratóriumi és Képpalkotó Diagnosztikai Tanszék két neuroradiológusában tapasztalt munkatársa retrospektív módon, a betegek kimenetelét illetően vakon végezte. A CT felvételek (felvételi és kontroll) két 16 szeletes MDCT (Multidetector Computed Tomography) scannerrel készültek. A supratentorialis szeletvastagság 5-10 mm, az infratentorialis szeletvastagság 2.5-4 mm volt. Képelemzésre a natív felvételek képanyagát használtuk. A DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) formátumú képeket egy offline munkaállomásra továbbítottuk további feldolgozás céljából. A képi adatok kvantitatív értékelése 3D Slicer programcsomaggal történt, mely a Brigham and Women's Hospital Surgical Planning Laboratory és az MIT fejlesztése. Félautomata szegmentációt végeztünk, melynek során a program MeasureVol moduljával meghatároztuk a következő térfogatokat (cm<sup>3</sup>-ben): intracranialis térfogat, teljes haematoma térfogat; intraparenchymalis haematoma térfogat; intraventricularis haematoma térfogat. A kapott

értékekből kiszámoltuk a relatív térfogatokat is a teljes, az intraparenchymalis, az intraventricularis haematoma térfogatok és az intracranialis térfogat hányadosaként (egység nélkül).

### 3.3.3. Neuropathológiai értékelés

Az autopsziákra általában a halált követő 48 órán belül sor került. Az agyboncolások a Neurológia Klinika Neuropathológiai Laboratóriumában történtek. A 10% formalinban fixált agyak coronalis szeletelésekor megerősíthető volt a klinikai diagnózis. Hasonlóan az in vivo is használt diagnosztikához, ABC/2 eljárással becsültük meg a haematoma térfogatát, azon a feltételezésen alapulva, hogy a haematoma térfogata közelíthetően megfeleltethető egy ellipszoidnak, kivéve a kifejezetten szabálytalan alakú vérezéseket. Az ellipszoidok leírhatóak a három egymásra merőleges tengelyen megadható Cartesian koordinátákkal. Az egymást követő coronalis szeleteket a posterior felszínükkel felfelé lapra fektettük, majd minden szeleten mértük az állományvérezések legnagyobb átmérőit (mm) a horizontális, valamint egy arra merőleges síkban. Ezt az utóbbi két átmérőt neveztük az ABC/2 formulában az A és B átmérőeknek, melyek egyébként nem feltétlenül estek ugyanarra a korongra. Minden korongról fotódokumentáció készült. Habár a korongok eredetileg 10 mm vastagságúak voltak, minden korong vastagságát négy különböző ponton újra megmértük, feltételezve, hogy az agyállomány a fixáció során zsugorodott. Ez utóbbi mérések átlagaként egy-egy korong precíz vastagságát, ezek összegeként pedig a korábban említett két átmérőre merőleges síkban a harmadik, legnagyobb átmérőt kaptuk, azaz a C értéket az ABC/2 formulából. Ahol a haematoma nem érintette a korong teljes vastagságát (az első és az utolsó korongokon), egy pálca segítségével mértük az adott korongra eső haematoma kiterjedést. A korongozásnak és a fixációnak köszönhetően nem volt mindig pontosan elkülöníthető a coagulum parenchymára és kamrákra eső kiterjedése, így az ABC/2 formula az intraparenchymalis és intraventricularis hányad együttesének felelt meg. A mért térfogatértékeket  $\text{cm}^3$ -ben adtuk meg. A relatív haematoma térfogatot a felvételtkor készült koponya CT-n látható intracranialis térfogat segítségével generáltuk.

### 3.3.4. Statisztikai analízis

A haematoma növekedési indexét az alábbi képlettel két lépésben számítottuk (log a természetes logaritmust jelzi):  $L = \log(hpb2/(1-hpb2)) - \log(hpb1/(1-hpb1))$ , és  $növekedési\ index = \exp(L)/(1 + \exp(L)) - 0.5$ , ahol a *hpb* a haematoma és az intracranialis tér térfogatának a hányadosa; *hpb2* a teljes haematoma térfogat (melyet a második térfogatmérésből kaptunk túlélőkben a kontrol CT, elhunytakban pedig a neuropathológiai vizsgálat eredményeire (ABC/2) támaszkodva) és az intracranialis térfogat (túlélőkben a kontrol CT, elhunytakban az első CT alapján számolva) hányadosa; *hpb1* a teljes haematoma térfogat és az első CT alapján számított intracranialis térfogat hányadosa (mind túlélőkben, mind elhunytakban). A negatív növekedési index a haematoma kiterjedésének csökkenését, a pozitív növekedési index a haematoma kiterjedésének növekedését jelezte.

Az értékeket folytonos változók esetén a számtani átlaggal és a szórással (SD), kategorikus változók esetén pedig a felvett értékek relatív gyakoriságával jellemeztük mind a túlélő, mind az elhunyt csoportban. A vizsgált faktorok és a 30 napos halálozás, mint kimeneti változó összefüggését logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk. Ahol szükséges volt, ott az összefüggések vizsgálatkor transzformációt alkalmaztunk vagy az adott magyarázó tényező négyzetre emelt változatát is szerepeltettük a modellben. A korrigálatlan elemzésben összefüggést mutató változókkal kezdtük a többszörös regressziós modellt. Kollinearitás esetén azt a változót szelektáltuk ki, amelynek szerepeltetését klinikai célszerűség alapján kevésbé fontosnak ítéltük. A kihagyott változókat egyesével rendre hozzáadtuk az így kialakult modellhez, és megtartottuk, ha klinikailag jelentékeny vagy statisztikailag szignifikáns hatást mutattak. A végső többszörös regressziós modell illeszkedését a Hosmer–Lemeshow-próbával ellenőriztük. A szignifikancia határa  $\alpha = 0.05$  volt. A pontozórendszer kialakításához a halálozás modell által számított valószínűségét minden vizsgált egyénre meghatároztuk, és származtattuk az így kapott számhalmaz minimumát, 10., 20., ..., 90. percentilisést és maximumát. A végső modell együtthatóit beépítettük egy táblázatkezelő programba, amely megmutatja, hogy egy adott beteg – a rá jellemző adatok alapján – a halálozási



valószínűség percentilis skáláján a vizsgált mintánkban hol helyezkedne el. A statisztikai számítások Stata Statistical Software (StataCorp. 2009) segítségével készültek.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A klinikai és neuropathológiai diagnózisok összehasonlító elemzése**

Minden betegről (n=100) készült koponya CT felvételkor. Felmerülő thrombolysis esetén a stroke-os betegekről CT angiographia is történt. Huszonnégy órával később minden thrombolysissel kezelt beteg esetében megismételtük a koponya CT-t. Kontroll koponya CT készült akkor is, ha a beteg hanyatló neurológiai statusa ezt megkívánta annak érdekében, hogy bármi kezelhető vagy fenyegető okát felderíthessük az állapotromlásnak (pl. haemorrhagia, HT, másodlagos agytörzsi vérzés, térfoglaló oedema, stb.)

Klinikailag 64 beteg esetében (62.74%, nők n=40, férfiak n=24, átlag 62.6 év, SD 6.51) szerepelt klinikai diagnózisként az acut ischaemiás stroke, függetlenül attól, hogy látszott-e a felvételkor készült koponya CT-n infarctus vagy korai ischaemiás jel. Tíz beteg esetében a kezelés során az ischaemiás infarctus vérzéses transzformációjára derült fény.

Boncoláskor 59 esetben territorialis ischaemia, 5 esetben lacunaris infarctus volt. A territorialis ischaemiák közül 34 esetben (16 thrombolysált, 18 nem thrombolysált betegnél) az infarcerált terület vérzéses átalakulása látszott. A haemorrhagiás transzformációkat a már korábban leírtak szerint csoportosítottuk: HI1: kis petechiák, HI2: összefolyó petechiák, PH1: jelentősebb vérzés, mely már enyhe térfoglaló hatással bír, de az infarcerált terület kevesebb, mint 30%-át érinti, PH2: az infarcerált terület nagyobb, mint 30%-át érintő jelentős bevérzés, mely térfoglaló hatású vagy bevérzés az ischaemiás területen kívül. A 64 ischaemiás stroke miatt kezelt beteg közül 22 beteget kezeltek thrombolysissel. A 22 thrombolysált beteg közül 6 esetben (27.3%-ban) nem látszott, 16 esetben (72.7%-ban) látszott HT, melyből 10 esetben már a koponya CT eredménye alapján ismert volt a HT, 6 esetben csak az autopsia során

derült rá fény. A 42 nem thrombolysált betegből 24 esetben (57.1%-ban) nem látszott, 18 esetben (42.9%-ban) látszott HT, a 18 eset mindegyikét autopsia igazolta. Az általunk vizsgált, HT-val járó eseteknél HI1 26.5%-ban, HI2 29.4%-ban, PH1 29.4%-ban és PH2 14.7%-ban fordult elő. A HT-val rendelkező stroke betegek közül egyetlen beteg sem kapott terápiás dóziszú anticoaguláns kezelést a hospitalizáció során, 4 esetben azonban a beteg felvételét megelőzően warfarint vagy kumarint szedett, úgy, hogy mind a 4 beteg esetében hatástalan (<1.7) INR szintet észleltünk felvételkor. Profilaktikus dóziszú LMWH terápiát 31 beteg, thrombocytá-aggregatio gátló kezelést 17 beteg kapott.

A koponya CT eredményei alapján klinikailag 22 betegnél diagnosztizáltak állományvérzést (21.56%, nő n=6, férfi n=16, átlagéletkor 75 év, SD 19.7). Az agyboncolások során az említett esetekben megerősítést nyert a diagnózis. A klinikai dokumentáció szerint egy esetben trauma, egy esetben pedig anticoaguláns gyógyszerelés szövődményeként alakult ki a vérzés. A neuropathológiai feldolgozás egy esetben cerebrális amyloidosist, egy esetben pedig arteriovenosus malformációt talált aetiológiaiaként. A boncolás egyetlen esetben igazolt állományvérzést úgy, hogy klinikailag ez nem volt ismert; egy enyhe vertebrobasilaris területi keringészavar tünete miatt kezelt férfibeteg váratlan halálának hátterében rupturált arteria basilaris fusiformis aneurysmára és következményes súlyos subarachnoidealis vérzésre derült fény.

Az autopsia mind a 3 primer agydaganat és a cerebrális és/vagy cerebellaris metastasisok 4 esetében alátámasztotta a klinikai diagnózist. A primer agydaganat két esetben astrocytoma, 1 esetben gliosarcoma volt. A metastasisok eseteiben a primer tumor pulmonalis adenocarcinoma (n=1), ductális emlőcarcinoma (n=1), sigillocellularis gyomorcarcinoma (n=1) és szájüregi uvulát érintő carcinoma (n=1) volt.

Az általunk vizsgált betegpopulációban két esetben volt a klinikai diagnózis a központi idegrendszer infekciója. Az agyboncolás mindkét esetben megerősítette a diagnózist.

Az autopsia négy esetben megerősítette a klinikailag már diagnosztizált, életet nem veszélyeztető kórállapotokat (pl. neuronális heterotopia és microgyrificatio, arachnoidealis cysta, silent aneurysma, makroszkóposan opaleszkáló, szövettani

vizsgálattal mononuclearis infiltrációt mutató meninxek korábbi meningitis következményeként).

## **4.2. Sejthalál mechanizmusok ischaemiás stroke-ban**

### **4.2.1. Western blot vizsgálat**

A tisztított PARP-1 proteinnel történt Western blot eljárás során a teljes hosszúságú PARP-1 ellenes PARP-1 antitest (Serotec) mind a 116 kDa-os (ekvivalens a teljes hosszúságú PARP-1-gyel), és kevésbé intenzív reakcióval a 89 kDa-os PARP-1-et is detektálta. In vitro ACA-3-mal történt PARP-1 hasítást követően a teljes hosszúságú PARP-1-nek megfelelő szignált teljesen elveszítettük. A hasított PARP-1 ellenes antitest (Promega) csak a hasított PARP-1-nek megfelelő sávot detektálta (89 kDa).

A későbbiekben a szövegben a PARP-1 a teljes hosszúságú PARP-1-nek felel meg (de nem zárja ki teljesen annak a lehetőségét, hogy kis mennyiségű hasított PARP-1 p89 fragmentumát is detektálja). A p89 fragmentum kimutatására a hasított PARP-1 ellenes specifikus antitestet (Promega) alkalmaztuk az immunhisztokémiai eljárások során.

### **4.2.2. Post-ischaemiás PARP-1 immunoreaktivitás**

A kontroll agyak mintáiban csak néhány neuronban látszott PARP-1 immunoreaktivitás ( $n = 2$ ). Post-ischaemiás PARP-1 immunoreaktivitás mind a neuronok magjában, mind azok cytoplasmájában, sőt a nucleolusokban is látszott. A PARP-1 pozitív neuronális nucleusok maximuma az infarctus magjában látszott az első postinfarctusos napon, mely aztán a periinfarctusos régióra tevődött át a második napon (a legnagyobb szám 23 óránál és 39 óránál látszott az említett esetekben).

A PARP-1 immunreaktív neuronok átlagos száma a periinfarctusos régióban volt a legmagasabb. A nuclearis PARP-1 pozitivitás a neuronális ischaemiás (necrosis) pontszámmal pozitívan korrelált, kivéve a legkifejettebb ischaemiás károsodás régióját (csak két agyi szekcióban, Score 4) ( $p=0.013$ ). Az említett eltérés a stroke-ot követő két

hétben végig látható volt. A contralateralis féltekében a nuclearis PARP-1 pozitivitás a 2. napon érte el a maximumát, majd a 3. napon visszaesett.

A cytoplasmaticus PARP-1 immunreaktivitás a periinfarctusos régió neuronjaiban kifejezettebb volt, mint az infarctus magjában (4.6 (SE 0.8) vs. 2.3 (SE 0.5);  $p=0.028$ ). A cytoplasmaticus PARP-1 immunreaktivitás a 3. postinfarctusos napnál látható maximummal hasonló időbeli dinamikát mutatott, mint a nuclearis PARP-1 festődés. A cytoplasmaticus PARP-1 a 6. túlélési napig a TUNEL pozitív sejtek növekvő százalékos arányával korrelált azokban a régiókban, ahol a neuronális ischaemiás pontszám 2, 3 vagy 4 volt, azaz az infarctus magjában és a periinfarctusos régió területén ( $p=0.01$ ).

#### **4.2.3. Post-ischaemiás hasított PARP-1 immunreaktivitás**

Míg a PARP-1 pozitivitás maximuma a neuronok magjában kevesebb, mint 3 nappal a stroke-ot követően látszott, a hasított PARP-1 immunreaktivitás ugyanitt később, a 3 naptól 2 hétig tartó időszakban volt a legmagasabb. A cytoplasmaticus hasított PARP-1 pozitivitás ugyanakkor a stroke-ot követő első 3 napban volt a legmagasabb. A nuclearis p89 pozitivitás a legkifejezettebb ischaemiás károsodás régióját kivéve pozitívan korrelált a neuronális ischaemiás pontszámmal ( $p=0.009$ ), a cytoplasmaticus p89 pozitivitás pedig fordítottan korrelált a növekvő pontszámú neuronális ischaemiás pontszámmal ( $p=0.001$ ).

#### **4.2.4. PAR-polymer immunreaktivitás**

PAR immunreaktivitás a kontroll agyakban a legkifejezettebben a neuronok cytoplasmájában látszott. Két agy (1. és 6. eset) periinfarctusos régiójában, melyek neuronális ischaemiás pontszáma 2 volt, mind a neuronok magjában, mind a neuronok cytoplasmájában kifejezetten intenzív volt a PAR immunreaktivitás, míg két másik, magas neuronális ischaemiás pontszámmal (4 pont, infarctus mag) rendelkező esetben (12. és 13. eset) a PAR immunreaktivitás elsősorban a neuronok nucleusában látszott.

#### **4.2.5. PARP-1 és PAR egyidejű jelölése post-ischaemiás agyszövetben**

A hasított PARP-1 (p85) immunfluoreszcens pozitív neuronok száma magasabb volt, mint a teljes hosszúságú PARP-1 pozitív sejtek aránya, egybehangzóan az immunhisztokémiai kísérletek eredményeivel. A PAR-fluoreszcencia a neuronális magokban (FITC) együtt jelentkezett a teljes hosszúságú és a hasított PARP-1 pozitivitással. Az említett régiókhoz képest a contralateralis félteke metszeteiben kevesebb PAR-immunfluoreszcens sejt látszott.

#### **4.2.6. ACA-3 immunreaktivitás**

ACA-3 immunreaktivitás a kontroll agyak mintáiban csupán néhány sejtben látszott. A post-ischaemiás mintákban az ACA-3 expresszió a szürkeállomány neuronjainak cytoplasmájában kb. 15 órával stroke-ot követően lett nyilvánvaló.

Az infarctus magban a hyperacut fázisban körülbelül négyszeres növekedés látszott az immunpozitív ACA-3 sejtek számában. A periinfarctusos régióban az ACA-3 immunreaktív neuronok száma megháromszorozódott egy hét alatt.

Az ACA-3 pozitív neuronok száma ezt követően jelentősen csökkent, 2 hétnél idősebb tüneteket mutató csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az acut (kevesebb, mint 3 napos) ischaemiás csoportban ( $p=0.002$ ). A contralateralis féltekében a neuronális ACA-3 immunreaktivitás szintén emelkedő tendenciát mutatott, majd a kontroll minták eredményeihez hasonló lett. ACA-3 expresszió a neuronális nyúlványokban a stroke-ot követő 2. napon látszott az infarctus magban. Kettős jelölésű immunfluoreszcenciával az ACA-3 pozitív neuronális nyúlványok bizonyos mértékig együtt fordultak elő a TUNEL pozitív magokkal.

#### **4.3. A 30 napos kimenetel vizsgálata spontán, supratentorialis lokalizációjú intracerebralis vérzésekben**

A 81 túlélő beteg vizsgálatából 8 beteget a második CT hiánya miatt kizártunk. A 75 elhunyt betegből egynél ACM aneurysma rupturája miatti subarachnoideal is vérzés igazolódott. Egy másik beteg esetében a vérzést agyi metastasis bevérzése okozta, így ez

utóbbi két beteget szintén kizártuk a vizsgálatból. Tizenkét esetben az agy nem volt alkalmas a neuropathológiai mérésekre multilobaris, szabálytalan alakú vérzés vagy pedig post-mortem károsodás miatt, mely lehetett a koponyából történő eltávolításkor bekövetkező sérülés, de lehetett a nagyméretű haematoma okán fragmentálódott parenchyma miatt is. Mindemellett 9 esetben hiányos volt a klinikai dokumentáció. Összességében így a vizsgálatunkba bevont populáció 59 elhunyt és 66 túlélő esetet tartalmazott.

#### **4.3.1. A 30 napos mortalitás prediktorai**

A 30 napos mortalitás és a vizsgált diszkrét és folyamatos változóink közül az életkorral való összefüggés a szignifikancia határértékénél volt, a felvételnél észlelt systolés vérnyomás és a serum glükózszt szint szignifikánsan magasabb, a vérlemezkeszám pedig szignifikánsan alacsonyabb volt az elhunyt betegek csoportjában. A serum káliumszint átlagértéke nem különbözött szignifikánsan a túlélők és az elhunytak között, ugyanis az utóbbi csoport számos tagjának hypo- és hyperkalaemiás értékei voltak, melyek átlagolása közel normális értéket eredményezett, azonban a normálistól eltérő káliumszint szignifikánsan gyakrabban fordult elő az elhunyt betegek csoportjában. Az egyéb változók (nem, alkoholfogyasztás, dohányzás, felvételi pulzusszám) nem mutattak szignifikáns összefüggést a 30 napos mortalitással.

Összességében a nem, az aktuális dohányzás, a nagymennyiségű alkoholfogyasztás, a diastolés vérnyomásérték és a felvételi pulzusszám nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. A laboratóriumi paraméterek között vizsgáltuk az érkezőkor vett serum nátrium-, kálium- és glükózsztintjét, a süllyedést, valamint a haemoglobin, fehérvérsejt- és vérlemezkeszámot, a máj- és vesefunkciós paramétereket, valamint a koagulációs paramétereket. Mindezek közül a fatális kimenettel a serum káliumszint mutatott szignifikáns összefüggést, melynek minden irányú eltérése növelte a fatális kimenetel valószínűségét. További prediktornak bizonyult a magasabb serum glükóz és az alacsony vérlemezkeszám is.

A túlélő és elhunyt betegek CT jellemzőinek és volumetriás értékeinek összehasonlításakor a stroke kezdete és az első koponya CT között eltelt idő kifejezett és fordított arányosságot mutatott a 30 napos mortalitással. A túlélő csoportban a felvételi és a kontroll CT között eltelt idő 10.7 (SD 5.05) nap volt. Az elhunyt betegeknél az átlagos túlélési idő 7.7 (SD 6.4) nap volt. Az első CT-n látható, teljes és intraparenchymalis haematoma abszolút térfogat szignifikánsan különbözött a két csoport között. Ugyanígy szignifikánsan különbözőek voltak a relatív haematoma térfogatok. A haematoma növekedés indexe a kimenetel igen erős prediktora volt. Az intraventricularis vérzés korai megjelenése és annak kiterjedése szintén nagyon erősen korrelált a fatális kimenetellel. Túlélőkben a felvételtkor készült és a kontroll koponya CT-n látható teljes haematoma térfogatok között kb. 43% csökkenés látszott, a relatív haematoma térfogat 42%-ot csökkent. Ugyanekkor elhunytakban a felvételtkor készült koponya CT-n látható, valamint az autopsia során mért teljes haematoma térfogatok között kb. 54% növekedés látszott és a relatív haematoma térfogat is 56%-kal nőtt. A haematoma intraventricularis megjelenése mind a kezdeti CT-n, mind a követéses vizsgálatoknál gyakoribb volt az elhunyt csoportban.

#### 4.3.2. A SUSPEKT pontozó skála

A multiplex regressziós analízis alapján a 30 napos mortalitás számos változóval szignifikáns korrelációt mutatott: serum glükóz (*Sugar*); teljes haematoma térfogat (*Size*); systolés vérnyomás (*Pressure*); intraventricularis vérzés megjelenése (*Extension to the ventricular system*); serum káliumszint (*Kalium*). Ezek, valamint a borderline szignifikanciát mutató életkor (*lifeTime*) használatával megalkottunk egy hat faktort pontozó skálát, a *SUSPEKT* skálát. A *SUSPEKT* pontozó skála használatával primer supratentorialis vérzésekben lehetőség nyílik a kimenetel becslésére. A valószínűség (*pr*) egy táblázat alapján a kért változók kalkulált koefficienssel történt szorzatainak összegéből (*sbx*) az Euler-féle szám (*e*) segítségével számolható:  $e^{sbx}/(1+e^{sbx})$ , melynek értéke aztán egy percentilis táblázat alapján értékelhető.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. A klinikai és neuropathológiai diagnózisok összehasonlító elemzése

Az, hogy a Debreceni Egyetem Neurológia Klinikája stroke centrumként működik, magyarázza a tanulmányunkban szereplő stroke betegek döntő többségét. Az autopsia az általunk vizsgált betegpopulációban az állományvérzések, primer és metastaticus daganatok és központi idegrendszeri fertőzések eseteiben megerősítette a klinikai diagnózist. Az állományvérzések közül két esetben a neuropathológiai vizsgálat választ adott az aetiológiára is, fényt derítve egy esetben cerebralis amyloid angiopathiára, valamint másik esetben arteriovenosus malformációra. Egy vertebrobasilaris területi keringészavar miatt felvett beteg hirtelen halálának okát, az arteria basilaris aneurysma rupturájából származó subarachnoidealis vérzést egyértelműen csak boncolással sikerült tisztázni.

Az autopsia az ischaemiás stroke eseteiben szolgált a legjelentősebb többletinformációval. Az irodalomban közölt adatok a HT előfordulását tekintve rendkívül eltérők attól függően, hogy képalkotó vagy autopsiás eredményekre alapozódott-e a tanulmány, aszerint hogy a vizsgált betegek kaptak-e anticoaguláns, antithromboticus vagy fibrinolyticus kezelést, valamint a képalkotó eljárásokon alapuló tanulmányokban attól függően, hogy az adott képalkotó vizsgálatot a stroke kialakulásához viszonyítva mikor végezték el. Az eredményeket a képalkotó vagy autopsiás eredmények összehasonlításakor mindemellett nem csupán a detektálás módja teszi nehezen összevethetővé, de nyilvánvalóan a vizsgált betegcsoport is jelentősen eltérhet az utóbbiaknál biztosan fatális kimenetel miatt. Kerényi és mtsai 245 ischaemiás stroke beteg autopsiás eredményeinek feldolgozásakor 29%-ban találtak HT-t. Lodder és mtsai 48 supratentorialis lokalizációjú ischaemiás stroke eset neuropathológiai vizsgálatakor 33%-ban találtak HT-t. Toni és mtsai 150 beteget vizsgáltak anterior keringés területében kialakult keringészavart követően. Egy héttel a stroke-ot követően vagy koponya CT vagy autopsia szolgált a HT detektálására, mely arányaiban 43% volt, ennek 89%-a petechiás vérzés, 11%-a kiterjedtebb haematoma volt. Celik és mtsai 86



ACM területi territorialis infarctuson átesett olyan beteget vizsgáltak, akik nem kaptak sem thrombocyta-aggregatio gátlót, sem anticoagulánst. A stroke kialakulását követően 72 órával készült koponya CT alapján a HT aránya az összes általuk vizsgált betegből 8.5%, azonban az ACM területi stroke eseteket vizsgálva 40.6% volt. Okada és mtsai 160 acut ischaemiás stroke beteget vizsgáltak. Koponya CT vizsgálatra alapozott eredményeik azt mutatták, hogy összesen 40.6 %-ban alakult ki HT, melynek 15.4 %-a látszott az első 1-4 napban, 67.7%-a látszott az első 10 napban és 100%-ban látszott a 30 napos koponya CT-n, 1 hónapon túl egyetlen esetben sem detektáltak újkeletű HT-t. Hornig és mtsai 65 beteg vizsgálatakor 28 esetben találtak HT-t, melynek 40%-a az első héten, míg további 60%-a látszott a második post-stroke héten elkészült koponya CT felvételen. Mindezek az eredmények jól mutatják, milyen nehéz meghatározni a HT diagnosztizálására legalkalmasabb időt, mely bizonyos terápiás beavatkozások hatásait, szövődményeit vizsgáló, meghatározott időszakra vonatkozó tanulmányokban a vizsgálat kezdetén már célzottan tervezhető. A mindennapi klinikai gyakorlatban azonban úgy, hogy annak gyakorisága és időpontja megbízható és költségghatékony is legyen, nehezen definiálható. Az ischaemiás stroke miatt kezelt betegek premortem kezelése hanyatló tudattal és kritikus általános állapotban gyakran elhúzódó lehet, akár napokig, hetekig is tarthat, a mi anyagunkban a stroke és a halál között eltelt átlagos időtartam 11.71 nap volt (SD 13.16). Emiatt a kritikus időszakban a HT kialakulása sokszor csak ismételt képakotó vizsgálatokkal (koponya CT vagy MRI) lenne lehetséges, mely azonban sem etikai, sem finánciális szempontok miatt nem megengedhető. Kontroll CT általában a thrombolysist követően 24 órával történik, míg a thrombolysissel nem kezelt betegekben nem is készül rutinszerűen kontroll CT, ha azt a beteg állapota nem követeli meg vagy éppen nem teszi azt lehetővé. Mindemellett számos tanulmányban megerősítették, hogy a HT-k jelentős többsége nem jár a neurológiai tünetek rosszabbodásával.

Irodalmi adatok szerint a HT-k különböző típusainak előfordulása is eltérő az acut stroke kezelésekor alkalmazott terápia, valamint az eltérő definíciók szerint. Tanulmányunkban a HT-kat a már korábban Fiorelli és mtsai által leírtak szerint csoportosítottuk kis és összefolyó petechiákat, valamint 30%-nál kisebb és nagyobb,

vagy az infarcerált területen kívül eső parenchymás haematomákat elkülönítve. Az általunk vizsgált HT esetekben a HI1 26.5%-ban, a HI2 29.4%-ban, a PH1 29.4%-ban, a PH2 14.7%-ban fordult elő. Okada és mtsai szintén autopsziás adatokat használva csak a kérget érintő kis petechiákat (56.9%), diffúz haemorrhagiát (18.5%), kis (3 cm-nél kisebb átmérőjű) (13.8%) és masszív (3 cm-nél nagyobb átmérőjű) haematomákat (10.8%) különítettek el. Fiorelli és mtsai az ECASS I tanulmányban vizsgálták akut stroke-ban az intravenás rt-PA kezelést követően kialakuló HT-k típusát és gyakoriságát. Vizsgálataik placebo kontroll mellett történtek, a HT detektálása 36 órán belül készült koponya CT-n látható eltérésekre alapozódott. Az általunk vizsgált esetektől nagymértékben eltérő betegpopuláció, valamint a HT kizárólag képalkotó eljárásokra alapozott megállapítása miatt HT altípusok megoszlása tekintetében eredményeink nem összevethetőek. Közleményük azonban megerősíti a korábban megjelent vizsgálatok eredményeit, miszerint rt-PA kezelést követően a HT előfordulási gyakorisága magasabb, kiterjedése nagyobb. A mi tanulmányunkban a PH1-2 eseteinek döntő többsége thrombolysissal kezelt betegekben alakult ki. Mindemellett felvetődik a kérdés, mi lehet az oka annak, hogy a jelenleg rendelkezésre álló képalkotó eljárások birtokában is ekkora hányadot képviselnek a csak autopsziával diagnosztizált HT esetek. Ennek részben az állhat a háttérben, hogy thrombolysis végzése esetén a kontroll CT általában a thrombolysist követően 24 órával történik. Az rt-PA féléletideje ugyan csak néhány perces, a coagulációs cascade-ra gyakorolt hatása azonban elhúzódó.

Fiorelli és mtsai, valamint Berger és mtsai az ECASS I és ECASS II tanulmány adatainak feldolgozásával mindkét adatbázis eredménye alapján kizárólag a PH2 esetekben láttak összefüggést a vérzéses átalakulás kialakulása és az akut fázisban látható klinikai romlás szempontjából, a HT 1-2 és PH 1 típusú bevérzések nem befolyásolták a klinikai statust és a kimenetelt. A NINDS rt-PA tanulmányban elemzett symptomás intracerebrális vérzések 70%-a az ECASS klasszifikáció szerint parenchymás haemorrhagiának felelt meg. Az ECASS tanulmány symptomás intracerebrális vérzéseinek is jelentős hányada, 73.5%-a a parenchymás vérzések 1 és 2. csoportjának felelt meg. Ezek az adatok azt jelzik, hogy azok a HT-k, melyek neurológiai hanyatláshoz vezetnek, általában a parenchymás vérzések kategóriájába tartoznak, dens haematoma

formájában jelennek meg és kifejezett térfoglaló hatásuk van. Az általunk vizsgált PH2 típusú haematomák mindegyike thrombolysissel kezelt betegben alakult ki és mindegyike ismert volt már premortem is a kontroll koponya CT alapján. Mindemellett a stroke ellátásra szakosodott intenzív osztályos kezelés és a multiparametriás monitorozás mellett is viszonylag nagy arányban lehetett csak autopsiával igazolni a haemorrhagiás infarctusok 1-2. típusát és az 1. típusú parenchymás haematomákat, noha a thrombolysissel kezelt betegek mindegyikében, a thrombolysissel nem kezelt betegek közül pedig, állapotrosszabbodás miatt, 6 esetben történt kontroll koponya CT.

Vannak tanulmányok, melyek azt is felvetették, hogy számos, akár a HT asymptomás formájának is lehet negatív következménye a kimenetelt illetően, összehasonlítva a HT-val nem járó esetekkel. Egy képalkotó eljárások eredményeire és pathológiai eredményekre alapozott feltételezés szerint a haemorrhagiás infarctusok és parenchymás haematomák pathogenesis is eltérő: amíg a haemorrhagiás infarctusok feltehetően multifocalis vörösvértest extravasatio következményei, döntően a szürkeállományban, addig a parenchymás haematomák egy ischaemia, majd reperfusio által károsított érből származó vérzésnek a következményei. Miután a bevérzés a már necroticus szövet területén történik, a folyamat gyakran nem jár a klinikai állapotban megfigyelhető változással, a haemorrhagiás infarctusok esetében még térfoglaló hatása sincs. Mindemellett a fatális kimenetelű acut stroke betegek általános állapota súlyos, halálukhoz még HT esetén is számos extracerebralis ok (pl. bronchopneumonia, szívelégtelenség, acut myocardialis infarctus, valamint tüdőembolia) vezethet.

Vizsgálatunkban nem az volt a célunk, hogy a HT okait, jeleit vagy kezelését feltárjuk, hanem hogy hangsúlyozzuk kialakulásának lehetőségét, így azt is, hogy még jelentős klinikai rosszabbodást nem mutató betegeknél is gondolni kell rá. Természetesen tanulmányunkban a fatális kimenetelű stroke esetek adatait dolgoztuk fel, tehát eredményeink nem extrapolálhatóak az összes ischaemiás stroke esetre. Érdeemes azonban a későbbiekben így is megfontolni, szóba jön-e különösen a nagyobb kockázattal járó betegek esetében egy rutinszerűen, a hazabocsátást megelőzően végzendő kontroll koponya CT mérlegelése. Ugyancsak megfontolandó a kontroll koponya CT elvégzése anticoaguláns kezelés indikációjának fennállása esetén is,

amennyiben annak beállítása a stroke subacut-chronicus szakaszában történik. Ezekben az esetekben a terápia elindítása előtt érdemes a koponya CT kontrollját elvégezni. Mindemellett szeretnénk hangsúlyozni az autopsia fontosságát, mely a stroke ellátásra szakosodott, multiparametriás monitorizálásra alkalmas intenzív osztályos kezelés és jelenleg rendelkezésre álló képalkotó vizsgálati módszerek mellett is tud új információval szolgálni. Bár sokszor megkérdőjelezzük a szükségességét, mindenképpen fontos visszajelzés mind a klinikusoknak, mind a radiológusoknak. A post-mortem neuropathológiai értékelés a minőségbiztosítás és az oktatás terén is kulcsfontosságú.

## **5.2. Sejthalál mechanizmusok ischaemiás stroke-ban**

Humán agyi ischaemiában a stroke kezdetétől számított néhány percen belül a vérellátás kritikus csökkenése neuronális károsodáshoz vezet. Az acut neuronális károsodás a PARP-1 túlaktiválódását eredményezi, melynek aztán túlzó mennyiségű poly(ADP-ribose) (PAR) szintézist, valamint az ATP és a NAD<sup>+</sup> szint csökkenése miatt kiterjedt neuronális sejthalál a következménye. Az általunk vizsgált normál agyszövetben csak néhány PARP-1 immunreaktív neuron látszott, mely egybehangzó a korábbi tanulmányok eredményeivel. A PARP-1 ischaemiát követő első három napban mind az infarctus magjában, mind a periinfarctusos régióban látható nuclearis jelenléte szintén megegyezik a korábbi humán kísérletek eredményeivel, azonban a mi anyagunkban a PARP-1 indukció lényegesen hosszabb ideig, egészen 2 hétig látszott az infarctus kialakulását követően. A cytoplasmaticus PARP-1 immunreaktivitás a periinfarctusos régióban volt a legjelentősebb és jól korrelált az apoptoticus morfológiát mutató TUNEL pozitív neuronok számával. A túlélési időtől függetlenül intenzív nuclearis és cytoplasmaticus festődést egyidejűleg ugyanabban a sejtben sehol sem láttunk, ami a PARP-1 ischaemia indukált subcellularis áthelyeződésére utal. A nuclearis immunreaktivitás mind a PARP-1, mind a PARP-1 hasítása után keletkező p89 fragmentum esetében a növekvő neuronális ischaemiás károsodás pontszámával korrelált, ám a p89 fragmentum expressziójának csúcsa kissé késleltetetten, 3 nappal az ischaemiát követően jelent meg. Azon neuronok száma, melyek p89 fragmentum

cytoplasmaticus jelenlétét mutatták, fordítottnan korrelált a növekvő ischaemiás károsodás jelenlétével. A PARP-1 enzimaktivitását a post-ischaemiás neuronok cytoplasmaticus PAR immunreaktivitása jelezte, mely együtt fordult elő a teljes hosszúságú és a hasított PARP-1 enzimekkel. Azt feltételezik, hogy a PAR elsősorban a nucleusban keletkezik, ám a későbbiekben a cytosolban található meg, ahol a mitokondriumokon keresztül indukálja a sejthalál útvonalak elindulását.

Cytoplasmaticus PARP-1 jelenlétet normál agyszövetben már egy olyan korábbi tanulmányban is leírtak, ahol 3 nem-neurológiai eset elemzése történt. Egy másik traumás agysérültekre fókuszáló vizsgálat azonban beszámolt nuclearis és egyidejű nuclearis-cytoplasmaticus PARP-1 jelenlétről is. A cytoplasmaticus jelenlét dominanciája a traumától a műtétig eltelt rövid idő esetén látszott. Mindezek a post-mortem vizsgálatok azonban végig magukban hordozzák annak az eshetőségét, hogy a megváltozott PARP immunreaktivitás valójában annak köszönhető, hogy a sejthalál útvonalak során a nuclearis tartalom elérhetőbbé válik az immunhisztokémiai festések számára. Meglepő módon a jelenlegi tanulmányban a PARP-1 nucleolaris jelenlétét is detektáltuk akár önmagában, akár nuclearis festődéssel egyidejűleg. A jelenség a 15-39 órás postinfarctusos időszakban látszott, kizárólag a periinfarctusos és a contralateralis zónákban, azaz a sejtek energiakészletének a tekintetében a megkíméltebb területeken. Habár neuronokban nucleolaris PARP-1 jelenlétről eddig nem számoltak be, már leírták in vitro MDBK, HeLa és CHO sejtekben, valamint rágcásáló fibroblasztokban, aktív RNS szintézis jeleként értelmezve.

Az ACA-3 kontrollokban látható elszórt jelenléte a kaszpázok axon növekedésben, synapticus plaszticitásban, valamint a normál agyi integritás fenntartásában betöltött szerepével van összefüggésben. Összességében a neuronalis cytoplasma ACA-3 immunreaktivitása a penumbrában volt a legmagasabb – ott, ahol a legjelentősebb az apoptózis előfordulás. Az ACA-3 jól ismert szerepe, hogy inaktíválja a PARP-1-t. Miután az utóbbi nuclearis elrendeződésű, ez az ACA-3 nuclearis lokalizációját sugallta volna, így meglepő volt, hogy a postischaemiás ACA-3 immunreaktivitás elsősorban a cytoplasmában látszott. Egy korábbi humán agyi ischaemiáról szóló tanulmányban az ACA-3 mind a nucleusban, mind a cytoplasmában

erősen expresszáldott. A mi eredményeink hasonlóak a Ferrer és Planas eredményeihez, akik felnőtt patkányok penumbrából származó mintáiban az ACA-3 jelenlétét Western blot analízissel csak a cytoplasmában tudták demonstrálni.

Jelenlegi megfigyeléseink és korábbi irodalmi adatok is azt a feltételezést támogatják, hogy a teljes hosszúságú és hasított PARP-1 túlnyomóan nuclearis jelenléte a necroticus, míg cytoplasmaticus jelenléte inkább a zajló apoptoticus folyamatokra utal. Néhány nap elteltével a penumbra területén zajló PARP-1 hasítás arra utal, hogy a sejt igyekszik a necroticus útvonalat az ATP igényes apoptózis irányába tolni. Egy korábbi tanulmányban in vitro sikerült demonstrálni, hogy apoptózis során a PARP-1 hasítást követően a p89 fragmentum a nucleusból a cytoplasmába migrálódik.

Egy humán atherothromboticus infarctusokat vizsgáló tanulmányban arra a megállapításra jutottak, hogy az apoptózis humán focalis agyi ischaemiában a sejthalál útvonalak alacsony hányadát érinti, mert számos neuron az ischaemiás területben az ischaemiás neuronalis sejthalál morfológiai eltéréseit mutatta ACA-3 pozitivitás nélkül. A mi eredményeink humán agyi ischaemiában az apoptózis és necrosis egyidejű jelenlétét támogatják, összhangban Sairanen és mtsainak eredményeivel, akik leírták, hogy a TUNEL pozitivitás csökkenése a necrosis nagyobb arányú jelenlétével korrelál.

A PARP-1 gátlás klinikai hasznát humán betegségekben, úgymint myocardialis infarctusban, stroke-ban és daganatos betegségekben komoly érdeklődés övezi, mely a PARP-1 mind cardiovascularis, mind inflammatoricus kórképekben megfigyelt kétélű kard szerepére, valamint DNS repair-ben betöltött szerepére alapozódik. Amint azt Graziani és Szabó összefoglalta, jelentős mennyiségű irodalom támogatja azt a nézetet, hogy az enyhe, kijavítható DNS károsodással rendelkező sejtek csakúgy, mint a súlyos DNS károsodással rendelkező sejtek PARP-1 gátlással egy közös útvonalra, azaz az apoptoticus sejteliminációra készíthetők. A kaszpáz-3 közvetített PARP-1 inaktiváció azt sugallja, hogy a PARP-1 aktiváció blokkolása lényeges pont az apoptózis folyamatában. Az az elgondolás, hogy a necrosis elleni védelem a PARP-1 inaktivációja és gátlása által lehetséges, elérhetővé teszi a necrosist a farmakológiai intervenciók célpontjaként. Kísérleteink támogatják azt a feltételezést, hogy a PARP-1 túlaktiválódásának gátlása terápiás támadáspontként is szóba jön humán agyi ischaemia

kezelésében azzal, hogy a további necroticus sejtfolymatok, a következményes sejszintű energiavesztés gátlását és számos pro-inflammatoricus szignál transzdukciós folyamat down-regulációját eredményezhetné.

Tanulmányunk fő korlátja az adatok deskriptív jellege, azaz intervencióra nem volt lehetőségünk és adataink immunhisztokémiai eredményeken alapulnak. Megítélésünk szerint az általunk használt neuropathológiai minta kiválóan alkalmas volt a mikroszkópos feldolgozásra, összehasonlítva pl. azzal, ha homogenizátumként kizárólag Western blot analízisre alapoztuk volna, mely utóbbinál például a cellularis lokalizáció információja elvész.

Szintén korlátként említhető a bár kiterjedt, azonban csak neuronokra vonatkozó adathalmaz, mely nem tartalmazza az egyéb, neurovascularis egységhez tartozó többi sejt adataiból származó eredményeket. Érdeemes megemlíteni azt is, hogy cohortunk súlyos, letális esetekből származó mintákat dolgozott fel.

### **5.3. A 30 napos kimenetel vizsgálata spontán, supratentorialis lokalizációjú intracerebralis vérzésekben**

A primer intracranialis vérzések fatális kimenetelének prediktorait széles körben vizsgálták, ennek ellenére még nem sikerült eddig egyetlen megbízható és széles körben használt értékelő skálát sem létrehozni. A mi célunk az volt, hogy egy relative egyszerű, reprodukálható, költségghatékony pontozóskálát alkossunk, mely klinikai és epidemiológiai adatokat használ. Eredményeink azt mutatják, hogy a systolés vérnyomás, a serum káliumszint, a serum glükózsint és a thrombocytaszám független és statisztikailag szignifikáns rizikófaktorai a primer intracranialis vérzések 30 napos mortalitásának. Emiatt egy klinikai kimenetel becslésére alkalmas prediktív pontozóskála használatát javasoljuk spontán intracranialis vérzések esetén, melynek neve SUSPEKT és összesen hat paramétert foglal magába (serum glükóz; teljes haematoma térfogat; systolés vérnyomás, intraventricularis vérzés jelenléte, serum káliumszint, életkor).

A laboratóriumi paraméterek közül a stroke kezdetén mért serum glükózsztint („SU”) szignifikáns összefüggést mutatott a 30 napos mortalitással. Korábbi tanulmányokban már leírtak hasonló eredményeket, ugyanakkor más kutatások nem igazolták hogy ICH-ban a hyperglycaemia szignifikáns és független prediktor lenne. Stead és mtsai a korai halálózást vizsgálták (<7 nap), melynek a felvételi emelkedett vércukorszint diabeteses és nem diabeteses betegekben is prediktora volt.

A haematoma mérete és méretének változása szintén lényegesnek bizonyult az állományvérzések utáni kimenetelt illetően. Tanulmányunkban mind az abszolút, mind a relatív haematomatérfogat („S”), mind a haematoma növekedési index, mind az intraventricularis vérzés jelenléte és mérete prediktornak számított a 30 napos mortalitás tekintetében. Mi egyébként az abszolút haematoma térfogat használatát ajánljuk, mivel ennek a számítása egyszerűbb és a prediktív értéke a relatív haematoma térfogatóval megegyező. A legtöbb közlemény egyetért abban, hogy haematoma kiterjedése ICH-ban mind a mortalitásnak, mind a csökkent funkcionális kimenetelnek erős determinánsa.

A felvételnél mért magas systolés és diastolés vérnyomás a haematoma méretének növekedésében meghatározó. Az emelkedett arteriális középvérnyomás és a magas diastolés vérnyomás a mortalitással, a magas systolés és diastolés vérnyomás mortalitással és a kedvezőtlen kimenetellel együttesen korrelál szignifikánsan. Dandapani és mtsai a felvételnél észlelt, 145 Hgmm-nél magasabb arteriális középvérnyomást találtak kedvezőtlennek a kimenetel szempontjából. Irodalmi adatok azonban arról is vannak, hogy a nagyon alacsony tensioérték sem kívánatos, a 120 Hgmm alatti systolés vérnyomás szintén összefügg a kedvezőtlen kimenetellel. Az INTERACT II. tanulmányban a systoles vérnyomás drasztikus (140 Hgmm alá) és mérsékelt (180 Hgmm) csökkentésének hatását hasonlították össze 6 órán belül kialakult, primer cerebrális állományvérzést szenvedett betegekben. A systolés vérnyomás intenzív csökkentésének statisztikailag kedvező hatását sem a haematoma növekedés, sem a rokkantság, sem a fatális kimenetel szempontjából nem sikerült igazolniuk. Vizsgálatukból kizárták mindazokat a betegeket, akiknél a klinikai vagy radiológiai tünetek alapján magas 24 órás mortalitást valószínűsítettek. A mi eredményeink a magas systolés vérnyomás („P”) prediktor szerepét igazolták a 30 napos mortalitás esetén.



Irodalmi adatok szerint az intraventricularis vér jelenléte és mennyisége („E”) erősen korrelál a kimenetellel akár az összes, akár csak a supratentorialis lokalizációjú vérzéseket tekintjük.

A legtöbb közlemény egyetért abban, hogy haematoma kiterjedése ICH-ban mind a mortalitásnak, mind a csökkent funkcionális kimenetelnek erős determinánsa.

Vizsgálataink alapján a serum káliumszint („K”) és a 30 napos halálozás között nagyon erős, szignifikáns összefüggés van, bármely irányba térjen is el a káliumszint a normálistól (mind a magasabb, mind az alacsonyabb értékek esetén), mely eredmény újdonságnak számít. Egy korábbi tanulmány 55 haemorrhagiás stroke-ot szenvedett betegből csaknem 40%-ban talált abnormális káliumszintet, mely döntően (34.55%) hypokalaemia, kisebb hányadában (3.63%) hyperkalaemia volt, azonban nem vizsgálták ennek a prognózisra vonatkozó hatásait. Egy korábbi közlemény szerint a thalamus vérzést szenvedett betegek között a serum kálium-, nátrium és kloridszint eltérései szignifikánsan gyakrabban fordultak elő, mint nem thalamus vérzésekben. Az elektrolit eltéréssel rendelkező betegek mortalitása pedig szignifikánsan magasabb volt a normál elektrolittal rendelkező betegekéhez képest. A mi eredményünket a káliumszint akár magasabb, akár alacsonyabb tartományokba történő eltéréseinek a morbiditásra és mortalitásra gyakorolt hatásait illetően feltehetően a kardiológiai hatások (kamrafibrillatio, hirtelen szívmegállás) is magyarázzák, azaz extrém káliumszintbeli eltérés esetén a halál nem az intracranialis nyomás fokozódása, hanem a cardialis dysfunctio miatt következhetett be.

Az életkornak („T”) borderline prediktív értéke volt ( $p=0.054$ ), mely egybehangzó a korábbi eredményekkel, melyek szerint az életkor szerepe az ICH kimenetelben kétséges. Néhány korábbi tanulmány szerint az életkor szignifikánsan korreláló, független faktor a halálos kimenetelt illetően, míg mások nem találtak ugyanilyen összefüggést vagy csak a 65 vagy 80 évnél idősebb betegcsoportban tudták mindezt igazolni.

Tanulmányunkban az alacsony vérlemezkeszám a halálos kimenetel prediktorának bizonyult. Korábbi irodalmi adatok megerősítik ezt, mind az alacsony thrombocytaszám, mind a thrombocyta dysfunctio szignifikánsan korrelált a haematoma

növekedésével. Az alacsony haemoglobin koncentráció nem volt összefüggésben a 30 napos halálos kimenetellel. Habár Kumar és mtsai az anaemiát és az alacsony fehérvérsejtszámot is összefüggőnek találták a nagyobb haematoma mérettel, a mi eredményeink nem igazolták egyik változó szignifikáns szerepét sem a 30 napos mortalitás tekintetében.

A tünetek kezdete és az első CT között eltelt idő erősen, fordítottan korrelált a halálos kimenetellel. Ez a paradox kapcsolat feltehetően azzal magyarázható, hogy azok a betegek kerültek mihamarabb kórházba, akiknek gyorsan romló, súlyos tünetei voltak, míg a kevésbé fenyegető állapotok (pl. kisebb méretű állományvérzéssel összefüggésben enyhébb tünetek) esetén a kórházba jutásig eltelt idő hosszabb volt.

A dohányzás és a 30 napos halálozás tekintetében nem találtunk összefüggést. Egy kínai tanulmányban a korábbi dohányzás mind ischaemiás, mind haemorrhagiás stroke esetén független rizikófaktor volt, míg mások szintén nem találtak kapcsolatot. Ikehara és mtsai a nagy mennyiségű alkohol fogyasztás és a haemorrhagiás stroke halálozás tekintetében férfiaknál szignifikáns összefüggést talált, ezzel szemben a mi eredményeink nem igazoltak összefüggést az alkoholfogyasztás és a halálos kimenetel között. Számos tanulmányban a miénkhez hasonló eredményeket közöltek.

Az ICH kimenetelét becsülő skálák számos faktorra fókuszálnak: életkor, nem, a haematoma lokalizációja és kiterjedése, az intraventricularis vérzés jelenléte, a haemorrhagia subarachnoideális térbe törése, a kiindulási koponya CT-n látható hydrocephalus, tudatzavar, focalis neurológiai tünetek észlelése felvételnélkor, magas NIHSS összpontszám, pulzusnyomás (systolés és diastolés vérnyomás különbsége). Az eddig használt prognosztikai skálákkal összehasonlítva a SUSPEKT kétségtelen előnye, hogy két könnyen detektálható paramétert is tartalmaz, egyrészt a serum káliumszintet, mely újdonságnak, valamint a hyperglycaemiát, mely egy korrigálható klinikai faktornak számít. A másik előny, hogy mindössze hat olyan paramétert vizsgál, melyek a haematoma térfogat kivételével konzervatív (azaz nem sebészi) módon is befolyásolhatóak.

Vizsgálatunk rendelkezik bizonyos korlátokkal a praehospitalisan elhunyt betegeket, a multilobaris vérzések kizárását, valamint a túlélő csoportban néhány esetben hiányzó második, kontroll CT-t tekintve.

## ÚJ EREDMÉNYEINK

1) A Debreceni Egyetem Neuropathológiai Laboratóriumában két év alatt elvégzett agyboncolások eredményeit feldolgozva igazoltuk, hogy a korszerű diagnosztikus eljárások rutinszerű és körültekintő alkalmazása mellett sem nélkülözhetőek az autopsziák, melyek a klinikai diagnózisok megerősítésén túl számos esetben pontosíthatják vagy tisztázhatják az in vivo elvégzett eljárásokkal nem felderíthető eseteket.

2) A szakirodalom alapján az ischaemiás stroke vérzések transzformációjának viszonylag gyakori kialakulása és gyakran tünete szegény, neurológiai állapotromlást nem okozó előfordulása ismert jelenség, azonban a témában megjelent közlemények döntő többsége képző eljárások adataira támaszkodik. Összehasonlítva a meghatározott időtartamra tervezett, az adott vizsgálatra megalkotott protokollok szerint elvégzett diagnosztikus eljárások adatait feldolgozó tanulmányokkal, vizsgálatunk retrospektív adatokkal szolgál tekintetben, hogy a *rutin* neurológiai gyakorlatban, a szakmai protokollokat követve végzett képző eljárások alkalmazása mellett is számos esetben rejtve marad az ischaemiás stroke vérzések transzformációja fatális kimenetű acut stroke esetekben. Megállapítottuk, hogy a HT a stroke ellátásra szakosodott kezelés mellett is viszonylag nagy arányban fordul elő és annak ellenére, hogy a mindennapi gyakorlatban a klinikusok tisztában vannak kialakulásának lehetőségével és ennek megfelelően erőfeszítések is történnek elkerülésére és felderítésére, napjainkban is csak autopsziával igazolható az esetek döntő többsége.

3) A PARP-1 nucleolaris jelenlétét neuronokban elsőként írtuk le. Tanulmányunkban a PARP-1 nucleoláris jelenlétét önmagában és nuclearis festődéssel együtt vizsgálva is sikerült detektálnunk. A jelenség a 15-39 órás postinfarctusos

időszakban látszott, kizárólag a periinfarctusos és a contralateralis zónákban, azaz a sejtek energiakészletének tekintetében a megkíméltebb területeken.

4) Jelenlegi megfigyeléseinkkel humán mintán igazoltuk azt a feltételezést, hogy a teljes hosszúságú és hasított PARP-1 túlnyomóan nuclearis jelenléte a necroticus, míg cytoplasmaticus jelenléte inkább a zajló apoptoticus folyamatokra utal.

5) Jelenlegi megfigyeléseinkkel humán mintán demonstráltuk azt a korábbi *in vitro* eredményt, hogy apoptosis során a PARP-1 p89 fragmentuma a nucleusból a cytoplasmába migrálódik.

6) Eredményeinkkel sikerült igazolni az apoptosis és necrosis egyidejű jelenlétét a penumbrában humán agyi ischaemiát követően.

7) Vizsgálataink alapján a serum káliumszint és a 30 napos halálozás között nagyon erős, szignifikáns összefüggést észleltünk, a káliumszint normálistól történő bármely irányú eltéréseivel, azaz mind a magasabb, mind az alacsonyabb értékek esetén.

8) A serum glükóz (Sugar); a teljes haematoma térfogat (Size); a systolés vérnyomás (Pressure); az intraventricularis vérzés megjelenése (Extension to the ventricular system), a serum káliumszint (Kalium), valamint az életkor (lifeTime) használatával megalkottunk egy hat faktort pontozó skálát, a SUSPEKT skálát, melynek használatával primer supratentorialis vérzésekben lehetőség nyílik a kimenetel becslésére. Az eddig használt prognosztikai skálákkal összehasonlítva a SUSPEKT előnye, hogy két könnyen detektálható paramétert is tartalmaz, egyrészt a serum káliumszintet, mely újdonságnak, valamint a hyperglycaemiát, mely egy korrigálható klinikai faktornak számít. További előnye a skálának, hogy mindössze hat olyan paramétert vizsgál, melyek a haematoma térfogat kivételével konzervatív (azaz nem sebészi) módon is befolyásolhatóak.



Nyilvántartási szám: DEENK/72/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szepesi Rita  
Neptun kód: A9D39O  
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

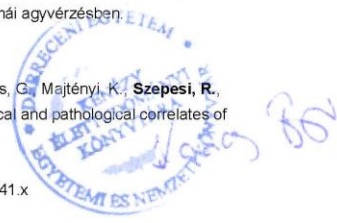
1. **Szepesi, R.**, Széll, I.K., Hortobágyi, T., Kardos, L., Nagy, K., Láncki, L.I., Berényi, E., Bereczki, D., Csiba, L.: New prognostic score for the prediction of 30-day outcome in spontaneous supratentorial cerebral haemorrhage.  
*Biomed Res. Int.* 2015 (Article ID 961085), 1-8, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/961085>  
IF:1.579 (2014)
2. Sairanen, T.\*, **Szepesi, R.\***, Karjalainen-Lindsberg, M.L., Saksi, J., Paetau, A., Lindsberg, P.J.: Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke.  
*Acta Neuropathol.* 118 (4), 541-552, 2009.  
\*T. Sairanen and R. Szepesi contributed equally to this study.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-009-0559-3>  
IF:6.397





További közlemények

3. Murnyák, B., Bodoki, L., Vincze, M., Griger, Z., Csonka, T., **Szepesi, R.**, Kurucz, A., Dankó, K., Hortobágyi, T.: Inclusion body myositis: Pathomechanism and lessons from genetics.  
*Open Med.* 10, 188-193, 2015.  
IF:0.153 (2014)
4. Murnyák B., **Szepesi R.**, Hortobágyi T.: A központi idegrendszeret érintő családi daganatszindrómák molekuláris háttere.  
*Orvosi Hetilap.* 156 (5), 171-177, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2015.30092>
5. Csonka, T., Murnyák, B., **Szepesi, R.**, Kurucz, A., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) and p53 labelling index correlates with tumour grade in meningiomas.  
*Folia Neuropathol.* 52 (2), 111-120, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2014.43782>  
IF:1.568
6. Csonka T., **Szepesi R.**, Bidiga L., ifj. Péter M., Klekner Á., Hutóczy G., Csiba L., Méhes G., Hortobágyi T.: A herpesencephalitis diagnosztikájáról egy esetismertetés kapcsán.  
*Ideggyógy. Szle.* 66 (9-10), 337-342, 2013.  
IF:0.343
7. Hofgárt G., **Szepesi R.**, Vámosi B., Csiba L.: A cerebrális állományvérzés diagnosztikája a számítortomográfia korszaka előtt.  
*Orv. Hetil.* 154 (44), 1743-1746, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2013.29739>
8. Rácz A., Széll I., Hofgárt G., Kardos L., **Szepesi R.**, Nagy K., Berényi E., Láncki L.I., Csiba L.: A vélemelkedésgátló és az antikoaguláns kezelés dilemmái agyvérzésben.  
*Vasc. Neurol.* 4 (3), 54-59, 2012.
9. Auriel, E., Bornstein, N.M., Berényi, E., Várkonyi, I., Méhes, G., Majtényi, K., **Szepesi, R.**, Goldberg, I., Lampé, R., Csiba, L.: Clinical, radiological and pathological correlates of leukoaraiosis.  
*Acta Neurol. Scand.* 123 (1), 41-47, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.2010.01341.x>  
IF:2.469





10. Ritter, M.A., Droste, D.W., Hegedűs, K., **Szepesi, R.**, Nabavi, D.G., Csiba, L., Ringelstein, E.B.:  
Role of cerebral amyloid angiopathy in intracerebral hemorrhage in hypertensive patients.  
*Neurology*. 64 (7), 1233-1237, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000156522.93403.C>  
IF:5.065

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,574**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,976**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.03.22.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Hortobágyi Tibor tanár úrnak minden tanácsát, segítségét, támogatását, a vizsgálathoz szükséges megfelelő munkakörülmények biztosítását.

Köszönettel tartozom Dr. Hegedűs Katalin professzornőnek a humorral és szeretettel átszótt tanácsaiért, segítségéért. Büszke vagyok a mai napig tartó barátságára.

Köszönöm Dr. Csiba László professzor úrnak a támogatását, tanácsait, javaslatait.

Hálával tartozom Perttu Lindsberg professzor úrnak a Helsinkiben végzett kutatómunka során nyújtott támogatásáért, szakmai segítségéért.

Külön köszönöm odaadó és precíz segítségét a neuropathológiai munkákban orozslánrészt képviselő asszisztensnőknek: Kondás Jánosnének, Porcsinné Hüse Irénnek, Kovácsné Puskás Anikónak, Nagy Katalinnak, Kiss Henriettának, valamint Tanja Eriksonnak és Taru Puhakkának.

Köszönöm Dr. Berényi Ervin professzor úrnak és Dr. Láncki Leventének a neuroradiológiai munkákban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kardos Lászlónak a statisztika világában történő idegenvezetést, a számításokban nyújtott segítséget.

Hálával tartozom Dr. Jenei Zoltán tanár úrnak, a Rehabilitációs Klinika és a Neurológia Klinika munkatársainak türelmükért, támogatásukért.

Köszönettel tartozom a diagnosztikus egységek munkatársainak a rutinvizsgálatok kapcsán generált klinikai adatokért.

Végtelen hálával tartozom családomnak. Mindenért.