

„Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei”

**Metabolomikai és biomarker vizsgálatok
aneurysma ruptura okozta subarachnoid
vérzésben**

Dr. Orbán Brigitta

Klinikai Idegtudományok Doktori Iskola

Témavezető: **Dr. Csécei Péter, Ph.D.**

Programvezető: Prof. Dr. Schwarcz Attila, Ph.D., D.Sc.

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Janszky József, Ph.D., D.Sc.

Pécsi Tudományegyetem



OGYDHT

Pécs

2026

1. BEVEZETÉS

Az aneurysma ruptura okozta subarachnoidealis vérzés (aSAV) súlyos, életet veszélyeztető neurológiai kórkép, amely a stroke-ok mintegy 5–10%-át teszi ki világszerte. Globális incidenciája átlagosan 10–13/100 000 fő/év, míg Magyarországon 8,3/100 000 fő/év. Az intenzív terápiás ellátás, valamint a sebészi és endovaszkuláris kezelési lehetőségek fejlődése ellenére az aSAV továbbra is magas morbiditással és mortalitással jár. A betegek körülbelül 15%-a még az egészségügyi ellátás elérése előtt elhalálozik, további 18–20% pedig a kórházi felvételt követő első három napban veszti életét. Az egyhónapos összmortalitás közel 50%.

Fontos kiemelni, hogy a halálozás és a kedvezőtlen neurológiai kimenetel nem elsősorban magának a vérzésnek tulajdonítható, hanem a másodlagos szövődményeknek, mint a korai agykárosodás (early brain injury, EBI), a vasospasmus és a delayed cerebral ischemia (DCI). Bár ezen folyamatok vizsgálata intenzív kutatások tárgyát képezi, patofiziológiai mechanizmusaiik mindmáig csak részben ismertek. Ennek következtében megbízható prognosztikai markerek a korai kockázatbecsléshez és a kimenetel előrejelzéséhez továbbra is hiányoznak.

Az elmúlt években a kutatások fókusza egyre inkább az innovatív molekuláris profilozó módszerek felé tolódott, amelyek új, az aSAV progressziójával összefüggő biomarkerek azonosítását teszik lehetővé. Ezek közül a metabolomika és lipidomika ígéretes, nagy áteresztőképességű analitikai technikákként jelentek meg, amelyek lehetővé teszik számos metabolit egyidejű meghatározását biológiai mintákban. E módszerek részletes „molekuláris pillanatfelvételt” nyújtanak a szisztémás és sejtszintű anyagcseréről, megragadva a betegség lefolyása során zajló dinamikus biokémiai változásokat. A megváltozott metabolikus útvonalak elemzése révén a metabolomika olyan új biomarkerek és mechanisztikus célpontok azonosítását teszi lehetővé, amelyek hagyományos biokémiai vizsgálatokkal nem feltétlenül detektálhatók.

Ennek ellenére, más neurológiai és szisztémás betegségekkel összevetve, az aSAV-specifikus metabolomikai vizsgálatok száma továbbra is alacsony és módszertanuk heterogén. A rendelkezésre álló adatok értékes betekintést nyújtanak az agyi energiaanyagcsere zavarába, az aminosav-anyagcserébe és az oxidatív stressz szerepébe a vérzést követően, azonban az eredmények részben ellentmondásosak és nagyobb betegpopulációkban még nem kellően validáltak. Mindez hangsúlyozza az integrált megközelítések szükségességét,

amelyek a metabolomikát további szisztémás markerekkel kombinálják az aneurysma ruptúrát követő komplex kórélettani folyamatok mélyebb megértése érdekében.

A központi idegrendszerre fókuszáló kutatások mellett egyre több bizonyíték utal a bél–agy tengely és az bél barrier diszfunkció jelentős szerepére cerebrovascularis betegségekben. Friss vizsgálatok szerint a bél mikrobiomjának megváltozása és a fokozott bélpermeabilitás hatással lehet a gyulladáshoz, az érfa reaktivitásra és végső soron az aneurysma stabilitására. Számos bél eredetű biomarker – így az I-FABP, az LBP és az sCD14 – érzékeny jelzője az enterocytakárosodásnak és a szisztémás immunaktivációnak. Ezek a molekulák az intestinalis epithelialis barrier károsodását tükrözik, amely elősegítheti mikrobiális termékek transzlokációját, ezáltal fokozva a szisztémás és neuroinflammatorikus folyamatokat.

Ezért a szérumból metabolomika és a bél barrierrel, valamint gyulladással összefüggő biomarkerek együttes vizsgálata átfogóbb képet nyújthat az aSAV hátterében álló szisztémás patofiziológiai mechanizmusokról. Az ilyen kombinált biomarker-panelek ígéretes lehetőséget kínálnak új prognosztikai indikátorok azonosítására, a korai kockázatbecslés javítására, valamint a személyre szabott terápiás stratégiák jövőbeni megalapozására ebben a komplex és súlyos kórképben.

2. CÉLKITŰZÉS

A DCI és az EBI hátterében álló patofiziológiai mechanizmusok mindmáig nem teljesen tisztázottak. Az aneurysma ruptura okozta subarachnoidealis vérzés komplex szisztémás és cerebrális hatásai miatt a betegség súlyosságát és prognózisát jelző biomarkerek és metabolikus mintázatok azonosítása kiemelt jelentőségű a klinikai gyakorlatban. Ennek megfelelően jelen doktori kutatás két, egymást kiegészítő célt tűzött ki az aSAV szisztémás hatásainak vizsgálatára. A kutatás elsődleges célja a bél barrier integritását és a szisztémás gyulladáshoz aktivációt jelző biomarkerek – az I-FABP, az LBP és az sCD14 – szérumszintjének vizsgálata volt aneurysma ruptura okozta subarachnoidealis vérzésen átesett betegekben. Különös hangsúlyt fektettünk a nozokomiális fertőzések zavaró hatásának kizárására annak érdekében, hogy az észlelt biomarker-változások elsősorban a központi idegrendszeri károsodás és az ahhoz társuló szisztémás válaszok képében értelmezhetőek legyenek. Emellett célunk volt annak megítélése, hogy ezen biomarkerek összefüggést mutatnak-

e a DCI kialakulásával, valamint a hosszú távú klinikai kimenetellel. A második célkitűzés az aSAV korai (24 óra) és késői (7 nap) fázisában bekövetkező szérum metabolomikai változások jellemzése volt LC–MS/MS analízis segítségével. A metabolitok széles spektrumának egyidejű mérésével célunk volt a megváltozott metabolikus útvonalak azonosítása, valamint azok lehetséges kapcsolatának vizsgálata a klinikai kimenetellel, különös tekintettel a prognosztikai jelentőséggel bíró metabolitokra. Összességében jelen munka elsődleges célja a bél–agy tengelyhez kapcsolódó biomarker- és metabolomikai adatok integrálása volt, amely új betekintést nyújthat az aneurysma ruptura okozta subarachnoidealis vérzés patofiziológiájába és hozzájárulhat a jövőbeni diagnosztikus és prognosztikus eszközök fejlesztéséhez.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgálatba bevont betegek

A vizsgálat egy egycentrumos, prospektív, obszervációs tanulmány volt, amelyet egy tercier neurovaszkuláris ellátó központban végeztünk az intézményi etikai bizottság engedélyével (IV/8468-1/2021/EKU). A vizsgálatba történő bevonás előtt minden beteg, illetve törvényes képviselőjük írásos beleegyező nyilatkozatot adott. A tanulmányba 18 évnél idősebb, spontán aSAV-el diagnosztizált betegeket vontunk be, akiket 2021 februárja és 2023 novembere között kezeltünk. Az aSAV diagnózisát az ictust követő 24 órán belül végzett natív koponya-CT vizsgálat igazolta, míg az intracranialis aneurysma jelenlétét CT-angiográfia vagy digitális szubtrakciós angiográfia (DSA) erősítette meg. Kizárási kritériumot jelentett a traumás eredetű subarachnoidealis vérzés, terhesség, az ictust követő 24 órán túli kórházi felvétel, az aneurysma kezelése nélküli esetek, arteriovenosus malformatióból származó vérzés, az írásos beleegyezés hiánya, az első vérzést követő reruptura, a kezelés során bekövetkező korai klinikai romlás, valamint akut vagy krónikus fertőzés jelenléte a felvételnél, beleértve a SARS-CoV-2 fertőzést. További kizárási kritériumot képeztek a jelentős szisztémás társbetegségek, úgymint malignus daganatok, krónikus máj- vagy veseelégtelenség, krónikus tüdőbetegség, gyulladásozós bélbetegség vagy egyéb krónikus gastrointestinalis kórképek. Az intézeti kezelési protokollnak

megfelelően minden alkalmas aneurysmát a diagnózist követő 24 órán belül endovaszkulárisan láttunk el. Az aneurysma ellátását követően a betegek legalább 12–14 napra a neurointenzív osztályra kerültek, ahol folyamatos neurológiai monitorozás történt a várható szövödmények – különösen a szimptomás cerebralis vasospasmus és a DCI – korai felismerése érdekében. A standard intenzív terápiás ellátás részeként korai enteralis táplálást alkalmaztunk orálisan vagy nasogastricus szondán keresztül az adekvát energiaellátás biztosítására, valamint profilaktikus per os nimodipin kezelést (60 mg napi hatszor) indítottunk a felvétel első napjától a vasospasmus megelőzése céljából. Szimptomás makrovaszkuláris vasospasmus gyanúja neurológiai állapotromlás esetén merült fel, amelyet újonnan kialakuló fokális neurológiai tünetek vagy a Glasgow Coma Scale legalább kétpontos csökkenése jelzett. A diagnózis megerősítésére mágneses rezonancia vizsgálat és MR-angiográfia történt a nagy intracranialis erek vizsgálatával. Amennyiben a nem invazív képalkotás nem volt egyértelmű, digitális szubtrakciós angiográfiát végeztünk, és szükség esetén intraarteriális nimodipin adására került sor. A demográfiai adatokat, az érrendszeri rizikófaktorokat (hipertónia, diabetes mellitus, dohányzás), a felvételtől klinikai állapotot, a laboratóriumi paramétereket, a radiológiai súlyossági pontszámokat (WFNS- és módosított Fisher-skála), valamint az intenzív osztályos beavatkozásokat prospektíven rögzítettük. Dokumentáltuk a fertőzőeses szövödmények, a DCI és egyéb kórházi események előfordulását. A DCI diagnózisa a nemzetközi konszenzus kritériumai alapján történt és megállapításához legalább két tapasztalt neurointenzív szakember egyetértése volt szükséges az egyéb lehetséges okok kizárását követően. Az izolált nagyérvasospasmust, klinikai tünetek vagy új ischaemiás léziók hiányában, nem tekintettük DCI-nek. A klinikai kimenetelt a vérzést követő 3 hónap után a módosított Rankin-skála (mRS) segítségével értékeltük strukturált telefonos interjú vagy személyes kontrollvizsgálat során. Kedvező kimenetelnek az mRS 0–3 értéket tekintettük. Az utánkövetéses kimenetelértékelést a vizsgálatától független, képzett szakemberek végezték, akik nem ismerték a vizsgálati adatokat. Egy kontrollcsoportot is bevontunk, amely nem rupturált intracranialis aneurysmával rendelkező, intervenciót nem igénylő vagy azt elutasító betegekből állt. Esetükben a szérummintavétel csak az aktív fertőzések és olyan szisztémás állapotok kizárását követően történt, amelyek befolyásolhatták a laboratóriumi méréseket.

3.2. Mintavételi és mintafeldolgozási protokoll

Az arra alkalmas betegektől artériás vérmintákat vettünk előre meghatározott időpontokban az ictust követően. Szérumminták a vérzést követő első napon (D1), valamint a szubakut fázisban (D7 vagy D9) kerültek levételre az adott analízis típusától függően. A vérmintákat natív üvegcsővekbe gyűjtöttük, majd a mintavételt követő 30 percen belül centrifugáltuk. A szérumot polipropilén csővekbe aliquotáltuk, és további feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A metabolomikai vizsgálatokhoz a szérummintákat jégen olvasztottuk fel, majd fehérjekicsapással készítettük elő. Ennek során $100\text{ }\mu\text{L}$ szérumhoz $400\text{ }\mu\text{L}$ acetonitrilt adtunk, a mintákat vortexeltük, majd $20\ 000\times$ g centrifugális erővel, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót gyűjtöttük, és ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás (UPLC–MS/MS) analízisnek vetettük alá. A méréseket Q-Exactive Focus tömegspektrométerrel, Dionex Ultimate 3000 UHPLC rendszerhez kapcsolva végeztük. A kromatográfiás elválasztás amid oszlopon, gradiens eluálási feltételek mellett történt. Az adatgyűjtés elsősorban MS1 szkennelési módban zajlott, negatív ionizációval, $100\text{--}800\text{ m/z}$ tömegtartományban. Az analitikai stabilitás és reprodukálhatóság biztosítása érdekében pooled minőségellenőrző mintákat (QC) injektáltunk rendszeresen a mérési sorozat során, az elfogadott metabolomikai irányelveknek megfelelően. A metabolitok megerősítésére további MS/MS vizsgálatok történtek adatfüggő akvizíciós módban, pozitív és negatív ionizáció mellett. A célzott biomarker-analízisek során a bélpermeabilitással összefüggő markerek, így az sCD14, az LBP és az FABP-I szérumszintjét kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kitekkel határoztuk meg a gyártók utasításai szerint. A kolorimetriás reakciót tetrametil-benzidin felhasználásával fejlesztettük, az abszorbanciát 450 nm hullámhosszon, mikroplatelolvasóval mértük.

3.3. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket SPSS és GraphPad Prism szoftverek alkalmazásával végeztük. A kategorikus változókat esetszám és százalékos megoszlás formájában, míg a folytonos változókat eloszlásuktól függően átlag \pm szórás vagy medián (interkvartilis tartomány) formájában adtuk meg. A csoportok közötti összehasonlításokhoz kategorikus adatok esetén khi-négyzet- vagy Fisher-exakt próbát, folytonos változók esetén független mintás t-próbát,

Mann–Whitney U-próbát vagy Kruskal–Wallis-próbát alkalmaztunk. A szérum bélpermeabilitási markerek közötti összefüggéseket Spearman-féle rangkorrelációs együttható segítségével vizsgáltuk. A metabolomikai adatokat standardizált feldolgozási és normalizálási eljárásokkal elemeztük, a többváltozós statisztikai analíziseket pedig a MetaboAnalyst szoftver alkalmazásával végeztük. A globális metabolikus különbségek feltárására az eltérő kimenetelű betegcsoportok között, különböző időpontokban, ortogonális parciális legkisebb négyzetek diszkriminancia-analízist (OPLS-DA) alkalmaztunk, a modell érvényességét permutációs tesztekkel ellenőriztük. A differenciálisan megváltozott metabolitokat a variable importance in projection értékek (VIP), a többszörös tesztelésre korrigált p-értékek és a fold change küszöbértékek alapján választottuk ki. A kiválasztott metabolikus biomarkerek erősségét ROC-görbe analízissel értékeltük, míg az útvonal elemzéseket a klinikai kimenetellel összefüggő biológiailag releváns metabolikus útvonalak azonosítására használtuk. A statisztikai szignifikancia határértékét $p < 0,05$ -ben határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A szérum metabolomikai profilok különbségei a kedvező és kedvezőtlen kimenetelű csoportok között aneurysma ruptura okozta subarachnoidealis vérzésben a korai és késői fázisban, a 3 hónapos kimenetel alapján

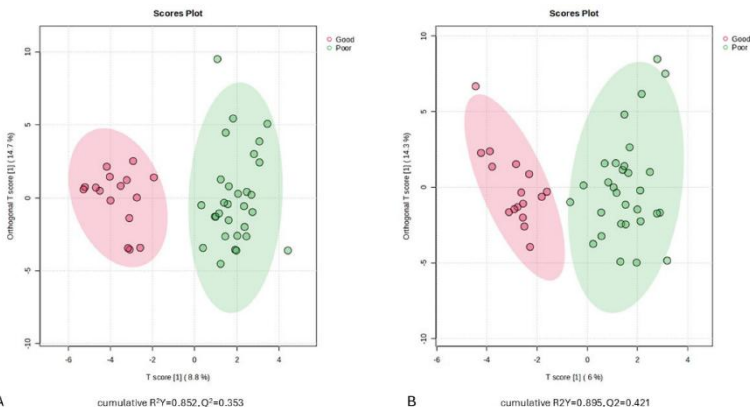
46 aSAV-beteg (kedvező kimenetel: $n = 16$; kedvezőtlen kimenetel: $n = 30$) szérummintáit elemeztük LC–MS-alapú metabolomikai módszerrel. A két kimeneteli csoport életkor és nem szerint összehasonlítható volt ($p > 0,05$). A módosított Rankin-skála (mRS) megoszlása a következő volt: mRS 0: 1 fő (2%), mRS 1: 11 fő (24%), mRS 2: 4 fő (8,7%), mRS 3: 7 fő (15%), mRS 4: 11 fő (24%), mRS 5: 8 fő (17%), mRS 6: 4 fő (8,7%). A kedvező kimenetelű csoporthoz képest a kedvezőtlen kimenetelű betegek esetében szignifikánsan magasabb módosított Fisher- és WFNS-pontszámokat észleltünk, valamint nagyobb arányban volt szükség gépi lélegeztetésre és külső kamra drain-re (mindegyik $p < 0,001$). A felvételnél mért C-reaktív protein-szint ($p = 0,027$), a lymphocytaszám ($p = 0,023$) és a szérum glükózszint ($p = 0,028$) szintén szignifikánsan magasabb volt a 3 hónap után kedvezőtlen kimenetelű csoportban. Ezzel összhangban a fertőzések szövődései előfordulása ($p = 0,001$), valamint a nasogastricus enterális táplálás szükségessége ($p < 0,001$) is szignifikánsan gyakoribb volt ebben a betegcsoportban.

Összesen 92 szérum metabolitot azonosítottunk. A D1 és D7 időpontok közötti metabolomikai változásokat OPLS-DA elemzéssel vizsgáltuk (kumulatív $Q^2 = 0,505$; $R^2Y = 0,777$). A differenciálisan expresszálódó metabolitok kiválasztása t-próba és fold change (FC) elemzés alapján történt. A szűrés kritériumai a következők voltak: VIP (variable importance in projection) $> 1,0$; $\log_2 FC \geq 1,2$ vagy $< 0,8333$; valamint $p < 0,05$. E kritériumok alapján összesen 14 differenciális metabolitot azonosítottunk, amelyek közül 4 felregulált, míg 10 downregulált volt (1. táblázat). A ROC-analízis alapján kizárólag a homocisztein mutatott megfelelő diszkriminatív képességet a korai és késői mintavételi időpontok elkülönítésére (AUC = 0,838).

Metabolites	p-Value ^a	FDR ^b	FC ^c	VIP ^d	AUC
Homocysteine	<0.0001	0.0000	0.54299	2.5649	0.838
Pantothenate	<0.0001	0.0022	0.72975	2.0931	0.736
Theobromine	<0.0001	0.0022	0.27842	2.3236	0.732
Homogentisate	<0.0001	0.0022	1.4076	1.3739	0.736
Pregnenolone Sulfate	<0.0001	0.0023	0.27842	2.1133	0.727
Paraxanthine	0.0005	0.0054	0.16176	2.1269	0.706
Glycocholate	0.0006	0.0054	1.9743	1.7525	0.670
Methyl Galactoside	0.0014	0.0116	0.62255	1.8354	0.691
Quinate	0.0019	0.0149	0.72407	1.6022	0.685
Biliverdin	0.0032	0.0218	0.75389	1.7025	0.677
Xanthurenate	0.0042	0.0257	1.4583	1.6431	0.672
Glycochenodeoxycholate	0.0046	0.0267	2.0485	1.3549	0.670
Bilirubin	0.0051	0.0278	0.74985	1.6738	0.668
Glutamate	0.0071	0.0361	0.72695	1.4018	0.662

1. Táblázat. A D1 és D7 időpontok közötti differenciális metabolitokat az aSAV-betegek szérumban kétmintás Student-féle t-próbával azonosítottuk, a többszörös összehasonlítás miatti korrekciót Benjamini–Hochberg módszerrel számított FDR segítségével végeztük. Szignifikánsnak az $FDR \leq 0,05$ értékű metabolitokat tekintettük. A fold change (FC) értékeket a csoportok átlagai alapján számítottuk, a kiválasztási kritériumok a következők voltak: $VIP > 1,0$; $\log_2 FC \geq 1,2$ vagy $< 0,8333$; $p < 0,05$

A kedvező és kedvezőtlen kimenetelű betegek szérumban metabolomikai profiljainak pontosabb elkülönítése érdekében OPLS-DA elemzést végeztünk mindkét mintavételi időpontban (D1 és D7). Az OPLS-DA score plotok mérsékelt elkülönülést mutattak a két kimeneteli csoport között a D1 időpontban (kumulatív $R^2Y = 0,852$; $Q^2 = 0,353$; 1A ábra), míg a D7 időpontban az elkülönítés kifejezettebb volt (kumulatív $R^2Y = 0,895$; $Q^2 = 0,421$; 1B ábra).



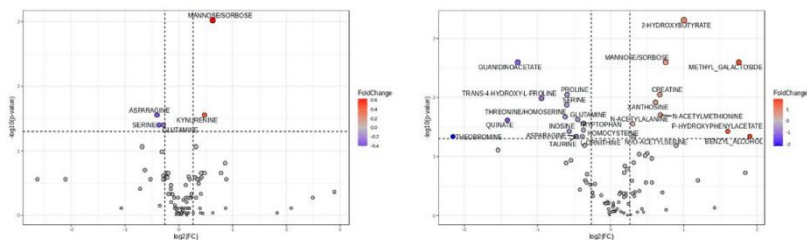
1. Ábra. Az OPLS-DA modellek score plotjai: (A) D1, (B) D7. Az ábrán a vízszintes tengely az első főkomponenst, míg a függőleges tengely a második főkomponenst jelöli. A zárójelben feltüntetett értékek az adott főkomponenshez tartozó score-t mutatják, amely az összvariancia magyarázott hányadát jelzi. D1: mintavétel az ictust követő 24 órában; D7: mintavétel az ictust követő 168 órában.

A differenciális metabolitok azonosítására *t*-próbát és fold change (FC) elemzést alkalmaztunk. A kiválasztási kritériumok a következők voltak: VIP (variable importance in projection) ≥ 1 , Log₂ FC $\geq 1,2$ vagy $<0,8333$, valamint $p < 0,05$; ezeket a 2. táblázat foglalja össze. E kritériumok alapján az eseményt követő 1. napon (D1) összesen 5, míg a 7. napon (D7) 19 differenciális metabolitot azonosítottunk. Ezek közül D1-en 2 metabolit emelkedett, 3 csökkent, míg D7-en 9 metabolit mutatott emelkedést és 10 csökkenést a kedvezőtlen kimenetelű betegekben. A kedvezőtlen kimenetelt az eseményt követő 1. napon (D1) a mannóz/szorbóz és a kinurenin szintjének emelkedése, valamint az aszparagin, szerin és glutamin szintjének csökkenése jellemezte. A 7. napon (D7) a kedvezőtlen kimenetelű betegekben a 2-hidroxibutirát, metil-galaktozid, mannóz/szorbóz, kreatin, xantozin, N-acetil-metionin, p-hidroxifenil-acetát, benzil-alkohol és N-acetil-alanin szintje emelkedett a kedvező kimenetelű csoporthoz képest. Ezzel párhuzamosan a kedvezőtlen prognózisú betegekben D7-en csökkent a guanidinoacetát, prolin, szerin, transz-4-hidroxi-L-prolin, treonin, glutamin, kinát, triptofán, inozin és homocisztein szintje. A differenciális metabolitok eltéréseit a kedvező és

kedvezőtlen kimenetelű csoportok között D1 és D7 időpontokban a volcano plotok szemléltetik. (2. ábra A, B)

Metabolites	p-Value ^a	FDR ^b	FC ^c	VIP ^d	AUC
D1					
Mannose/Sorbose	<0.0001	0.0009	1.5782	2.2981	0.868
Kynurenine	0.0006	0.0278	1.3946	2.2316	0.820
Asparagine	0.0009	0.0278	0.7551	1.8846	0.800
Serine	0.0020	0.0400	0.7720	1.7817	0.758
Glutamine	0.0022	0.0400	0.8195	1.7818	0.768
D7					
2-Hydroxybutyrate	<0.0001	0.0014	2.0034	2.2096	0.856
Methyl_Galactoside	0.0002	0.0050	3.3747	2.0167	0.820
Guanidinoacetate	<0.0001	0.0000	0.4144	2.0029	0.917
Mannose/Sorbose	0.0001	0.0031	1.6853	1.9738	0.835
Creatine	0.0004	0.0063	1.5934	1.8054	0.808
Proline	0.0003	0.0062	0.6618	1.7326	0.812
Serine	0.0015	0.0142	0.6596	1.6987	0.779
Trans-4-Hydroxy-L-Proline	0.0012	0.0121	0.5188	1.6620	0.785
Threonine/Homoserine	0.0067	0.0327	0.6503	1.6316	0.741
Xanthosine	0.0022	0.0183	1.5301	1.6144	0.770
Glutamine	0.0046	0.0282	0.7317	1.5320	0.752
N-Acetylmethionine	0.0006	0.0073	1.6020	1.4859	0.802
Quinate	0.0042	0.0279	0.3762	1.4790	0.754
P-Hydroxyphenylacetate	0.0039	0.0277	3.0389	1.4328	0.756
Benzyl_Alcohol	0.0067	0.0327	3.7385	1.3918	0.741
Tryptophan	0.0010	0.0113	0.7737	1.3769	0.789
Inosine	0.0105	0.0481	0.6753	1.3634	0.729
N-Acetylalanine	0.0031	0.0235	1.2340	1.3633	0.762
Homocysteine	0.0063	0.0327	0.7728	1.3288	0.743

2. Táblázat. Differenciális metabolitok listája a kedvező és kedvezőtlen kimenetelű betegek között D1 és D7 mintavételi időpontokban aSAV esetén. A p-értékeket two-tailed Student's t-test próbával számítottuk. A többszörös tesztelés miatt az FDR-t Benjamini–Hochberg módszerrel korrigáltuk. Szignifikánsnak az $FDR \leq 0,05$ értékű metabolitokat tekintettük. A fold change (FC) értékeket a csoportok számtani átlaga alapján számítottuk. A metabolitokat a kiválasztási kritériumoknak megfelelően azonosítottuk: $\log_2 FC \geq 1,2$ vagy $< 0,8333$, $VIP > 1,0$ (OPLS-DA alapján). D1: mintavétel az ictust követő 24 órában; D7: mintavétel az ictust követő 168 órában; FDR: false discovery rate; FC: fold change; AUC: area under the curve.

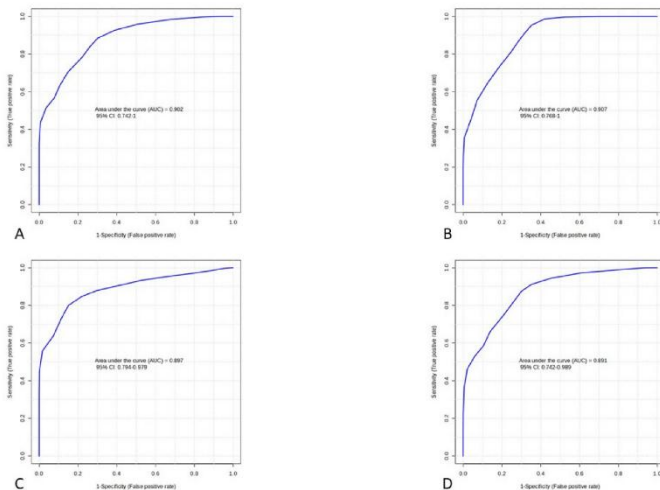


A

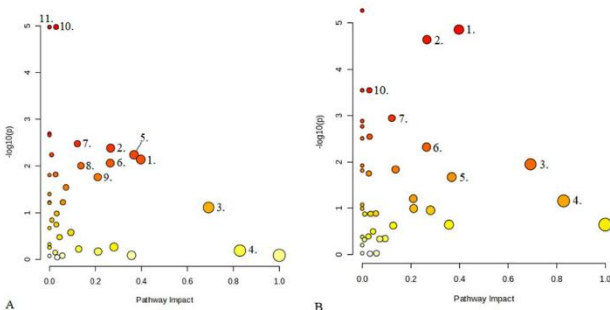
B

2. Ábra. Differenciális metabolitok szűrése. Volcano plot-ok: (A) D1 és (B) D7. A piros szín a felregulált metabolitokat, a kék a downregulált metabolitokat jelöli. A szürke metabolitok egyik csoportba sem tartoznak. D1: mintavétel az ictust követő 24 órában; D7: mintavétel az ictust követő 168 órában.

A differenciális metabolitok prediktív értékének elemzésére ROC-görbéket készítettünk a kedvezőtlen kimenetel előrejelzésére aSAV-betegekben. A $VIP \geq 1$ és $\text{Log}_2 FC \geq 1,2$ vagy $<0,05$ kritériumoknak megfelelő metabolomikai markerek a korai mintavételi időpontban (D1) felülmúlták a hagyományos klinikai biomarkereket a kedvezőtlen kimenetel előrejelzésében (3. ábra). A D7 metabolitok közül csak a $p < 0,001$ értékűeket vontuk be a modellbe. Ezt követően a különböző metabolikus útvonalakat MetaboAnalyst 5.0 segítségével elemeztük. A klinikai prediktorok kiválasztása bináris logisztikus regresszió alapján történt. Az egyváltozós elemzés során az életkor, a felvételi CRP, az mFisher-pontszám és a WFNS mutatott kapcsolatot a kimenetellel, míg a többváltozós modellben az életkor (OR: 1,112; 95% CI: 1,019–1,214; $p = 0,017$) és a WFNS (OR: 3,462; 95% CI: 1,238–9,513; $p = 0,018$) bizonyultak független prediktornak. Ezért ezek kombinált prediktív valószínűségét használtuk a klinikai prediktív modellben. A metabolikus útvonalak általános áttekintését a D1 és D7 időpontokra a 4. ábra szemlélteti.



3. Ábra. A biomarker-panel erőssége a kedvező és kedvezőtlen 3 hónapos kimeneteli csoportok elkülönítésére: (A) Klinikai markerek D1 időpontban, $AUC = 0,902$; 95% CI: 0,742–1. (B) Metabolomikai markerek D1 időpontban, $AUC = 0,907$; 95% CI: 0,768–1. (C) Klinikai markerek D7 időpontban, $AUC = 0,897$; 95% CI: 0,794–0,979. (D) Metabolomikai markerek D7 időpontban, $AUC = 0,891$; 95% CI: 0,742–0,989. AUC : area under the curve; CI : konfidencia intervallum. A klinikai markerek (életkor, WFNS) független prediktoroknak bizonyultak bináris logisztikus regresszió alapján, és kombinált prediktív valószínűségüket használtuk a klinikai predikciós modellben. D1: mintavétel az ictust követő 24 órában; D7: mintavétel az ictust követő 168 órában.



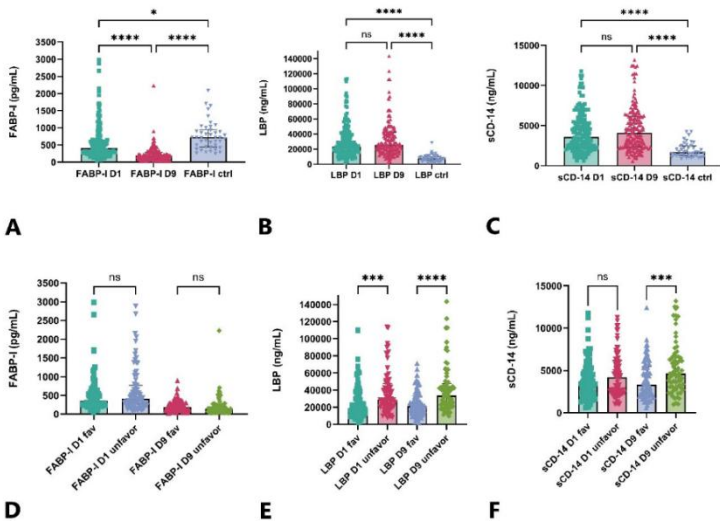
4. Ábra. Metabolikus útvonal-elemzés: (A) D1; (B) D7. A vízszintes tengely az útvonal hatásértékét, a függőleges tengely a $-\log_{10}(p)$ -értéket mutatja. Egy pont az ábrán egy metabolikus

útvonalat jelöl; a pont mérete arányos az útvonal hatásértékével, a színe pedig a p-érték nagyságát jelzi (sárgától pirosig a p-érték csökkenését). Érintett metabolikus útvonalak: 1, Arginin- és prolin-anyagcsere, 2, Glicin-, szerin- és treonin-anyagcsere, 3, Koffein-anyagcsere, 4, Taurin/hipotaurin-anyagcsere, 5, Triptofán-anyagcsere 6, Cisztein- és metionin-anyagcsere, 7, Glioxilát- és dikarbonsav-anyagcsere, 8, Arginin-anyagcsere, 9, Alanin-, aszparagin- és glutamát-anyagcsere, 10, Galaktóz-anyagcsere, 11, Amino-cukor és nukleotid-cukor anyagcsere.

4.2. Az aneurysma rupturája okozta subarachnoideális vérzés hatása kórházi fertőzés nélküli betegeknél az FABP-I, LBP és sCD-14 szintekre

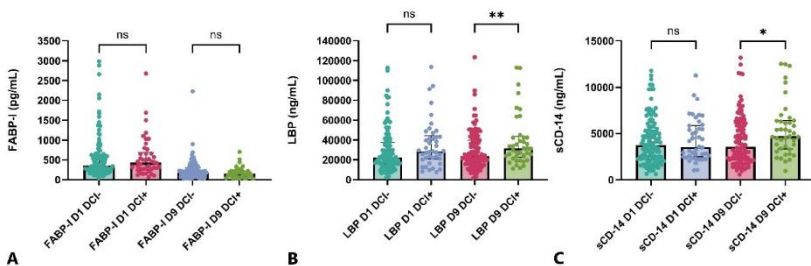
Összesen 206 aSAV-en átesett beteget vontunk be a vizsgálatba. Ebből 24 beteget kizártunk az alábbi okok miatt: súlyos alapbetegségek (11), aneurysma reruptura (2), súlyos vesekárosodás (2), utánkövetés hiánya (5) és elérhetetlen biomarker-mérések (9). Végül 177 aSAV-beteg felelt meg a beválasztási kritériumoknak és teljesítette a vizsgálati protokollt. A 177 beteg közül 128 fő (72%) nő volt, és 56 fő (32%) dohányzott. Az átlagéletkor 57,8 év volt (SD: 12 év). A kontrollcsoportba 100 egészséges, nem rupturált intracranialis aneurysmával rendelkező személy került bevonásra. Minden vizsgálatban részt vevő beteg endovaszkuláris kezelést kapott; nyitott műtéten átesett betegek nem szerepeltek a vizsgálatban. A 100 kontroll közül 71 fő nő volt, átlagéletkoruk 59,6 év (SD: 12 év). Az aSAV-betegek és a kontrollcsoport életkora, illetve a nők aránya között nem volt szignifikáns különbség.

A szérumban FABP-I szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az aSAV-betegek körében (D1 és D9 minták) a kontrollcsoportéhoz képest ($p < 0,05$). A betegcsoporton belül a késői mintákban (D9) az FABP-I szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak ($p < 0,001$) a korai mintákhoz (D1) képest (5A. ábra). Az LBP esetében szignifikánsan magasabb szérumszintet figyeltünk meg a betegek körében a kontrollcsoportéhoz képest ($p < 0,001$), azonban az időpontok (D1 vs. D9) között nem volt jelentős eltérés (5B. ábra). Hasonló eredmények születtek a szérumban sCD-14 szintjének vizsgálatakor is: az aSAV-csoportban szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) szérumszintet észleltünk a kontrollcsoportéhoz képest, azonban a D1 és D9 minták között nem volt lényeges különbség.



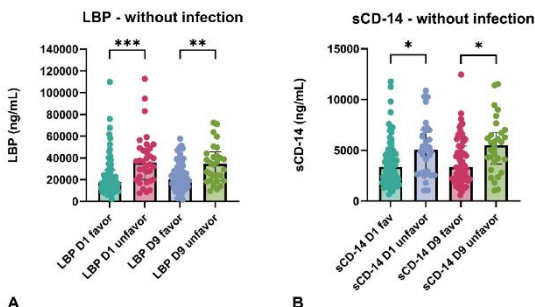
5. Ábra. FABP-I, LBP és sCD-14 szérumszintek az aSAV-betegek és kontrollok között (A–C), valamint különböző kimeneteli csoportokban (D–F). FABP-I: fatty acid-binding protein–intestinal, LBP: lipopolysaccharide-binding protein, D1: mintavétel az ictust követő 24 órában, D9: mintavétel az ictust követő 9. napon, fav: kedvező kimenetel (mRS 0–3), unfav: kedvezőtlen kimenetel (mRS 4–6), ns: nem szignifikáns, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. Kontrollszemélyek száma: 100. Kedvező kimenetelű betegek száma: 94. Kedvezőtlen kimenetelű betegek száma: 83.

A FABP-I szintek elemzése során a két kimeneteli csoport között sem a korai, sem a késői mintákban nem figyeltünk meg különbséget (5D. ábra). A kedvezőtlen kimenetelű csoportban mindkét mintavételi időpontban (D1, D9) szignifikánsan magasabb LBP-szérumszinteket észleltünk a kedvező kimenetelű csoporthoz képest (5E. ábra). A szérum sCD-14 szintjében a két kimeneteli csoport között csak a D9 mintavételi időpontban mutatkozott szignifikáns eltérés, míg a korai mintában (D1, 24 órával az ictus után) nem volt különbség (5F. ábra). A három vizsgált metabolit egyike sem mutatott korrelációt a DCI kialakulásával a betegség korai fázisában (D1). Ezzel szemben a késői fázisban (D9) a DCI-szubsorozatban mind az LBP, mind a sCD-14 szignifikánsan magasabb szérumszinteket ért el (6. ábra).



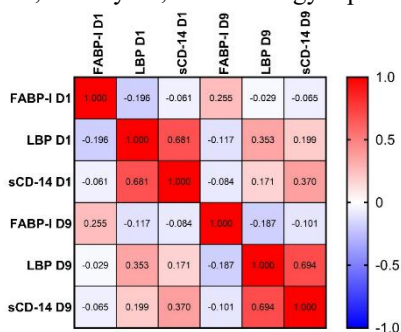
6. Ábra. FABP-I (A), LBP (B) és sCD-14 (C) szérumszintek a DCI-val rendelkező és nem rendelkező betegeknél. DCI: delayed cerebral ischemia, +: DCI-val rendelkező betegek, -: DCI nélküli betegek, FABP-I: fatty acid-binding protein-intestinal, LBP: lipopolysaccharide-binding protein, ns: nem szignifikáns, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. DCI-s betegek száma: 47 DCI nélküli betegek száma: 130.

Vizsgáltuk az LBP szérumszinteket a kórházi eredetű fertőzések kontextusában is és azt találtuk, hogy azoknál a betegeknél, akik a kórházi tartózkodás során nem kaptak fertőzést ($n = 116$; medián [IQR] CRP-szint a kórházi tartózkodás alatt: $5,7 [2-12]$), az LBP szintje mindkét mintavételi időpontban szignifikánsan magasabb volt a kedvezőtlen kimenetelű csoportban a kedvező kimenetelűekhez képest (7A. ábra). Hasonló, de gyengébb korrelációt tapasztaltunk az sCD-14 esetében is (7B. ábra). Azoknál a betegeknél, akik a kórházi tartózkodás során fertőzést kaptak ($n = 61$; medián [IQR] CRP-szint: $73,4 [53-112]$), nem észleltünk különbséget sem az LBP, sem az sCD-14 szérumszintekben a kedvező és kedvezőtlen kimenetelű csoportok között egyik mintavételi időpontban sem. A fertőzés nélküli csoportban ($n = 116$) elvégeztük a korrelációs elemzést a szérum CRP-szint és a korai (D1) valamint késői (D9) LBP és sCD-14 értékek között. Egyik marker esetében sem találtunk szignifikáns korrelációt sem a korai, sem a késői fázisban.



7. Ábra. LBP és sCD-14 szérumszintek aSAV-betegeknél kórházi fertőzés hiányában, a 3 hónapos kimenetel szerint. (A) LBP-szérumszint aSAV-csoportban fertőzés nélkül, (B) sCD-14 szérumszint aSAV-csoportban fertőzés nélkül. D1: mintavétel az ictus után 24 órával, D9: mintavétel az ictus után 9 nappal, favor: kedvező kimenetel (mRS 0–3), unfavor: kedvezőtlen kimenetel (mRS 4–6), *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. A csoportok betegszáma: kedvező kimenetel $n = 61$, kedvezőtlen kimenetel $n = 55$.

A korai (D1) és késői (D9) fázisban erős pozitív korrelációt figyeltünk meg az LBP és sCD-14 szintek között (8. ábra). Továbbá nem találtunk szignifikáns korrelációt a három metabolit és olyan demográfiai vagy klinikai tényezők, mint az életkor, nem, dohányzás, diabetes vagy hipertónia között.



8. Ábra. Heatmap az FABP-I, LBP és sCD-14 korrelációs mátrixáról. A heatmapen a piros pozitív, a kék negatív korrelációt jelöl. Minél sötétebb a szín, annál erősebb a korreláció. A korrelációs vizsgálathoz Spearman-féle rangkorrelációs tesztet alkalmaztunk. Szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$. A $p > 0,10$ értékeket fehér négyzetek jelzik. FABP-I: fatty acid-binding protein-intestinal, LBP: lipopolysaccharide-binding protein, D1: mintavétel az ictus után 24 órával, D9: mintavétel az ictus után 9 nappal.

5. DISZKUSSZIÓ

A jelen vizsgálatban UPLC-MS/MS rendszert alkalmaztunk az aSAV-betegek metabolomikai profi szintű változásainak vizsgálatára az ictust követő 1. (D1) és 7. napon (D7), valamint a 3 hónapos kimenetel alapján kedvező és kedvezőtlen prognózisú csoportok közötti különbségek feltárására. A legfontosabb megállapítások a következők: 1, Az ictust követő 24. órában a kedvezőtlen 3 hónapos kimenetelű csoportban szignifikánsan emelkedett mannóz/szorbóz és kinurenin szinteket, valamint csökkent aminosav-szinteket észleltünk. 2, Az ictust követő 168. órában a kedvezőtlen kimenetelű betegek szérumában jelentősen magasabb szinteket detektáltunk a következő metabolitokból: 2-hidroxi-butirát, metil-galaktózid, mannóz/szorbóz, kreatin, xantozin, N-acetilmetonin, N-acetil-alanin és p-hidroxi-fenilacetát. 3, A 168. órában a kedvezőtlen kimenetelű csoportban szignifikánsan alacsonyabb guanidinoacetát-szintet észleltünk. Emellett bizonyos esszenciális aminosavak szintje mind a korai, mind a késői mintavételi időpontban alacsonyabb volt ebben a csoportban. Ezzel szemben a késői mintavételi időpontban bizonyos N-acetil aminosav-származékok koncentrációja emelkedett a kedvezőtlen prognózisú csoportban. 4, A két mintavételi időpont összehasonlításakor a homocisztein szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a késői mintákban a korai mintákhoz képest. Az aSAV-t követő 24 órában a metabolomikai mérések alapján a kedvezőtlen kimenetelű csoportban szignifikánsan emelkedett kinurenin-szintet észleltünk. A kinurenin érzékeny markerként szolgál az akut fázisban zajló neuroinflammáció jelzésére, amely gyulladással összefüggő neurológiai kórképekre jellemző. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a kinurenin-út vonal aktivációja összefügg a kritikus állapotú betegek rosszabb kimenetelével, valamint a korai fázisú iszkémiás stroke-os betegek magasabb halálozásával és nagyobb infarktusvolumenével. Emellett a kinurenin-út vonal jelentősen túlműködik traumás agysérülés során bekövetkező gyulladás esetén is. Ezek a korábbi megfigyelések összhangban állnak a jelen vizsgálatban tapasztalt eredményekkel. Az aSAV-ban szenvedő, kedvezőtlen kimenetelű betegek fokozott gyulladással válaszolnak. Kritikus állapotú betegeken végzett metabolomikai vizsgálat során a kinurenin, szacharóz és p-hidroxi-fenilacetát magasabb szintje összefüggött a magasabb halálozási rátával. Jelen vizsgálatban a kedvezőtlen kimenetelű csoportban észlelt emelkedett kinurenin-szint jelentős akut neuroinflammáció jelenlétére utal. A guanidinoacetát (GAA) egy természetes aminosav-származék, amely a kreatin közvetlen előanyaga, argininből és glicinből

termelődik az L-arginin:glicin amidino-transzferáz (AGAT) enzim katalitikus hatására, elsősorban a vesében és a májban. Később a GAA kreatinná és homociszteinné alakul, főként a guanidinoacetát N-metiltranszferáz (GAMT) enzim segítségével, elsősorban a májban, de kisebb mértékben az agyban is. A GAA felhalmozódása az agyban és a testnedvekben (szérumszint $>16 \mu\text{mol/L}$) izomgyengeséggel, epilepsziával és értelmi fogyatékossgal jár GAMT-hiányos egyéneknél. Ezzel szemben a GAA szintjének csökkenését (szérumszint $<1,9 \mu\text{mol/L}$) krónikus vesebetegségben és diabetes mellitusban szenvedő betegeknél figyelték meg. A GAA potenciálisan GABA-A receptor agonistaként is működhet és modulálhatja a GABA-anyagcserét az agyban és a perifériás szövetekben. Emellett értágító hatással bír, valamint működhet foszfo kreatin-mimetikumként és alternatív energiaforrásként, különösen akkor, ha a kreatin rendelkezésre állása korlátozott. Értágító hatását két mechanizmussal fejt ki: 1, Gátolja a norepinefrin metilációját, ezáltal befolyásolva annak felezési idejét és a szimpatikus aktivitást. 2, Közvetett módon vazodilatációt idéz elő az arginin megőrzésével, ami elősegíti az arginin-mediált nitrogén-oxid (NO) termelést. Jelen vizsgálatunkban a SAV-t követő 7. napon a kedvezőtlen kimenetelű csoport szérum mintáiban GAA-hiányt, magasabb kreatinszintet és csökkent homociszteinszintet észleltünk a kedvező kimenetelű csoporthoz képest. A kedvezőtlen prognózisú csoport alacsonyabb GAA-szintje a GAA-termelés zavarával vagy fokozott felhasználással magyarázható. A GAA-hiány egyik lehetséges oka a fokozott átalakulás kreatinná, míg a homociszteinné történő átalakulás kevésbé kifejezett. Az elérhető GAA-szint csökkenése a súlyos állapotok következtében kialakuló máj- és vesefunkció-zavarokra is visszavezethető, amelyek a súlyos állapotú betegek jelentős részénél előfordulnak és rosszabb kimenetelhez kapcsolódnak. Az alacsony guanidinoacetát-szint felhívja a figyelmet a SAV késői szakaszában jelentkező jelentős energia-anyagcsere-zavarra. Továbbá, a kedvezőtlen prognózisú csoportban megfigyelt alacsony GAA-szint elméletileg korlátozhatja annak értágító és GABA-agonista hatásait. A megfigyelés klinikai jelentősége azonban jelenleg még bizonytalan, további vizsgálatokat igényel. Vizsgálatunkban a 7. napon vett szérummintákban szignifikánsan magasabb 2-hidroxi-butirát szinteket találtunk a rossz 3 hónapos kimenetelű csoportban. Agyi iszkémia során a máj β -hidroxi-butirátot termel, amelyet aztán az agy felhasznál. Klinikai vizsgálatokban lineáris összefüggést mutattak ki a ketontestek (KB) artériás koncentrációja és az agy általi felvétele között. Humán vizsgálatokban a megemelkedett KB-szintek már 72 órán belül megjelenhetnek a sérülést követően, a koplalás mértékétől függően.

A 2-hidroxi-butirát egy ketontest, amely pontosan jelzi a diabéteszes ketoacidózist gyermekeknél és serdülőknél. A ketózis inkább a metabolikus szabályozás köztes állapotát tükrözheti, nem feltétlenül súlyos akut betegséghez kapcsolódik. Ugyanakkor a ketontestek magas szintje számos kedvező hatással bír a központi idegrendszer működésére. A 2-hidroxi-butirát javítja a neurológiai funkciókat fokális ischaemia során, mérsékli a globális ischaemia és a stroke következményeit, valamint gátolja a neuronok pusztulását Alzheimer- és Parkinson-kór modellekben. Többféle mechanizmusa ismert az agyban, többek között: ioncsatornákkal való kölcsönhatás, hiszton-deacetiláz gátlása, közvetett antioxidáns aktivitás és neuroinflammáció gátlása. A β -hidroxi-butirát termelődése agyi ischaemia során előnyt jelenthet, mivel alternatív energiaforrásként szolgál az agy számára, megkerülve a glükóz szükségességét és csökkentve a káros tejsav képződés kockázatát. A β -hidroxi-butirát továbbá csökkenti az infarktus körül a glükóz-anyagcseréhez kapcsolódó reaktív oxigénfajok képződését és az astrogliosiszt, ezáltal javítva a neurogliovaszkuláris és funkcionális regenerációt az ischaemiás károsodás után. A BHB alternatív szénforrásként működik, támogatja az oxidatív foszforilációt (OXPHOS), valamint a bioenergetikai aminosavak és a glutation termelődését, amelyek kulcsfontosságúak a redox egyensúly fenntartásában. Emellett a BHB elősegíti a T-sejt választ fertőzések során és jelezheti a ketogenezis zavart működését. Összességében a megnövekedett 2-hidroxi-butirát szintek metabolikus diszregulációt jelezhetnek akut subarachnoidealis vérzés esetén. Alternatív magyarázatként ez a növekedés kompenzációs válasz is lehet, amely az energiatermelés ketózis irányába történő eltolódását tükrözi, ami több kedvező hatással bír az idegrendszer működésére. Vizsgálati kohorszunkban minden beteg megfelelő enterális táplálásban részesült, az irányelveknek megfelelő mennyiségben és minőségben. A kritikus állapotú betegek enterális táplálásának elsődleges célja a metabolikus igények kielégítése, valamint a tápanyag-ellátottság fenntartása vagy javítása. A kedvezőtlen kimenetelű csoportban a késői fázisban megfigyelt magasabb ketontest-szintek valószínűleg nem a táplálás hiányosságának, hanem a táplálástól független energia-anyagcsere-változásoknak tudhatók be. Összességében a kedvezőtlen 3 hónapos kimenetelű csoportban a 7. napon vett szérummintákban jelentősen magasabb 2-hidroxi-butirát szintek jelenléte az anyagcsere-folyamatok megváltozását, valamint az energia-anyagcsere vagy metabolikus stressz módosulását jelezheti a kedvezőtlen kimenetelű betegekénél. Jelen vizsgálatunkban azt tapasztaltuk, hogy a kedvezőtlen kimenetelű csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az aminosav-szint a jó kimenetelű csoporthoz

képeket mindkét mintavételi időpontban, kivéve az N-acetilmetionin és N-acetil-alanin koncentrációját. Sjöberg és munkatársai a subarachnoidealis vérzést követő első hét során az aminosav-szintek emelkedését írták le és a szérum mioinozitol közepes prediktív erejét mutatták ki az egy éves kedvező kimenetelre vonatkozóan. Egy 29 beteg bevonásával készült tanulmányban az aminosav-szintek magasabbak voltak a kedvezőtlen kimenetelű csoportban, azonban a különbség mértéke nagyon alacsony volt és csak a korai szakaszban (0–3 nap) figyelhető meg. Egy másik vizsgálatban, amelyben aSAV-betegek plazmamintáit elemezték, nem találtak különbséget az aminosav-szintek között a korai és késői mintákban, sem a jó és rossz kimenetelű csoportok plazmaszintjeiben; sőt, bizonyos aminosav-szintek csökkenést mutattak aSAV-betegek plazmájában a kontrollcsoporthoz képest. Tuoho és munkatársai hipermetabolikus állapotot figyeltek meg ICH- és aSAV-betegekben, akik műtéten estek át; hasonló eredményeket mutattak más vizsgálatok is, amelyek továbbá kimutatták, hogy a megnövelt aminosav-infúzió nem befolyásolja az aminosav-cserét. A szakirodalmi adatok és a jelenlegi vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy a vérben detektálható aminosav-anyagcsere-változások aSAV után számos tényező komplex hatásának eredményei (például a betegség súlyossága, posztoperatív táplálás stb.). Kritikus állapotban a makrotápanyagok anyagcsereje több szinten is megváltozik. Az energiaforrások felhasználása főként az endogén raktárak mobilizációjára támaszkodik, amelyet számos szabályozó mechanizmus irányít. Kritikus állapotú betegekben a szénhidrátok oxidációja jelentősebb mértékben fokozódik a korai szakaszban, mint a lipidek és a fehérjék oxidációja. Továbbá, ha a nitrogénbevitelt növeljük, miközben a kalóriaterhelést változatlanul tartjuk vagy csak a nitrogénhordozók összetételét módosítjuk, az esszenciális aminosavak ellátottsága elégtelenné válhat. Eredményeink alátámasztják ezt a korábbi megfigyelést, mivel jelentősen megnövekedett mannóz/szorbóz szinteket és csökkent aminosav-szinteket találtunk a kedvezőtlen kimenetelű betegeknel, mind a korai, mind a késői fázisban aSAV-ben.

A második vizsgálatban a következő fő eredményeket találtuk: (i) aSAV-betegek szérumában az LBP és az sCD-14 szintje jelentősen magasabb volt a nem rupturált kontrollcsoporthoz képest, míg a FABP-I szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a betegcsoportban, (ii) a FABP-I szintje a kimeneteli csoportok között nem mutatott jelentős különbséget, míg az LBP és sCD-14 szintje (különösen a D9 mintákban) szignifikánsan eltért a kedvező és kedvezőtlen kimenetelű csoportok között, (iii) az LBP és az sCD-14 a kórházi

fertőzéssel nem érintett betegeknél is különbséget mutatott a kedvező és kedvezőtlen kimenetelű csoportok között, (iv) a késői fázisban a DCI-csoportban az LBP és az sCD-14 szintje szignifikánsan magasabb volt, és (v) az LBP és az sCD-14 erős pozitív korrelációt mutatott mind a korai, mind a késői fázisban aSAV esetén. Először azt találtuk, hogy az FABP-I szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az aSAV-betegek körében a kontrollcsoporthoz képest, ami ellentétes volt várakozásainkkal. Ezen felül a betegcsoporton belüli korai és késői fázis értékei közötti csökkenés is szignifikáns volt. Ez a megfigyelés váratlan, figyelembe véve, hogy több, ischaemiás vagy gyulladásoz gasztrointesztinális betegséggel, illetve traumás agysérüléssel élő betegeket vizsgáló tanulmányban magasabb FABP-I szinteket mértek az egészséges kontrollokhoz képest. Hasonlóképpen, bizonyos pszichiátriai betegségekben és ischaemiás stroke esetén is emelkedett szérumban FABP-I szinteket figyeltek meg. Eredményeinkre többféle magyarázat is felmerül. Elméletileg a csökkent FABP-I szint a csökkent enterocyták számát vagy az intestinális funkció megváltozását tükrözheti. Korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy aSAV-betegek esetén a metabolizmus mind a korai, mind a késői fázisban a ketózis és alternatív energiaforrások irányába tolódik, még megfelelő enterális táplálás mellett is, különösen a kedvezőtlen kimenetelű betegeknél. Más tanulmányok is hangsúlyozták, hogy aSAV-betegek tápláltsági állapota mind a felvételtől, mind a kórházi tartózkodás alatt alapvető szerepet játszik a klinikai kimenetel alakulásában. Jól ismert, hogy az energiafelhasználás jelentősen megnő aSAV kialakulása után, azonban egy nemzetközi, multicentrikus intenzív osztályos tanulmány szerint az aSAV-betegek jellemzően alultápláltak voltak és a kalória- és fehérjebevitelük kevesebb, mint 60%-át kapták meg. Ezen túlmenően Hernandez és mtsai kimutatták, hogy a rövid enterális éhezés jelentős duodenális nyálkahártya-atrófiával és káros bélpermeabilitással járhat kritikus állapotú betegeknél. Ebből kiindulva feltételezhetjük, hogy a tápanyagbevitel elégtelensége károsíthatja a bél egészségét és csökkentheti az enterocyták proliferációját, valamint az aSAV-betegek korai alultápláltsága funkcionális enterocyták számának csökkenése révén csökkentheti az I-FABP szintézist. Vizsgálatunk során azt is megfigyeltük, hogy az LBP és az sCD14 szintje szignifikánsan magasabb volt a kedvezőtlen kimenetelű csoportban a kedvező kimenetelű csoporthoz képest. Az LBP egy szolubilis fehérje, amely az LPS-hez kötődik és azt a CD14-hez szállítja, aktiválva ezzel a toll-like receptorok (TLR-ek) révén, amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a veleszületett immunitás szabályozásában. A CD14 szolubilis formában is létezik (sCD14). Az LBP szintje a szérumban a bakteriaemia vagy

endotoxaemia kezdetét követően éri el a csúcspontját és akár 72 órán keresztül emelkedett marad. A véráramba kerülve az LBP az LPS-hez kötődik, elősegítve annak interakcióját a CD14 receptorokkal. A membránhoz kötött CD14 a TLR4-hez kapcsolódik, amely a CD14-hez kötött LPS jelét a sejtmagba továbbítja, elindítva egy kaskád, amely gyulladáshoz vezet. Az LBP-szintet klinikai indikátorként javasolták az „aktív endotoxaemia” jelzésére. Az emelkedett LBP-szint jelezheti a bakteriális komponensek, különösen az LPS-expozíciót és előre jelezheti a betegség progresszióját és a kedvezőtlen kimenetelt. Az LBP koncentrációjának emelkedését különböző metabolikus betegségekben is megfigyelték, amelyek a bélpermeabilitás változásaihoz és a bélmikrobiom átalakulásához kapcsolódnak. A plazma endotoxin-aktivitás növekedése magasabb LBP- és sCD14-szinttel járt együtt. Mind az LBP, mind az sCD14 emelkedett koncentrációja képes gátolni az LPS bioaktivitását in vitro és in vivo egyaránt. Az emelkedő LBP- és sCD14-szintek kompenzáló mechanizmusként szolgálhatnak a túlzott TLR4-stimuláció megakadályozására és a szisztémás gyulladás korlátozására is ischaemiás stroke-os betegekben. Klimiec és munkatársai vizsgálatában a keringő LPS forrását nem tudták meghatározni és nem találtak különbséget a szérumszintekben fertőzött és nem fertőzött betegek között, ami felvetette a bakteriális transzlokáció lehetőségét, mint hozzájáruló tényezőt. Ez arra utal, hogy az LPS a bélből juthat a véráramba, nem pedig nyilvánvaló fertőzés útján. Jelen vizsgálatunkban aSAV-betegek esetén, akiknél nem alakult ki kórházi fertőzés, az LBP és az sCD14 szintje szignifikánsan magasabb volt a kedvezőtlen kimenetelű csoportban. Bár az általunk vizsgált molekulák jól dokumentált szérum-markerek a bélpermeabilitás jelzésére, eredményeink alapján elmondható, hogy jelen vizsgálatunkban nem bizonyítják egyértelműen, hogy az LBP megjelenése a szisztémás keringésben feltétlenül a bélmikrobiomhoz kapcsolódó mikroorganizmusok terméke. Mindazonáltal a szervezet más mikrobiom-rendszerei (pl. tüdő, nemi szervek stb.) is érintettek lehetnek az aSAV által kiváltott pathofiziológiai stressz hatására, így endotoxinok ezekből a mikrobás részekből is felszabadulhatnak. Eredményeink tehát elsősorban azt mutatják, hogy bár nem lehet biztosan meghatározni az LBP és sCD14 szérumban való megjelenésének pontos eredetét és hogy ezek a molekulák miért érnek el szignifikánsan magasabb szinteket a kedvezőtlen kimenetelű csoportban, az egyik lehetséges forrás a humán bélmikrobiom lehet, amelynek endotoxinjai a bélpermeabilitás károsodása miatt az aSAV korai fázisában juthatnak a szisztémás keringésbe. Jelen vizsgálatunkban azt is megfigyeltük, hogy az LBP és sCD14

szérumszintje szignifikánsan magasabb volt a DCI-szubs csoportban. Mivel a DCI általában a 7–14. napon alakul ki, a késői fázisban a DCI-pozitív és DCI-negatív csoportok között megfigyelt különbség az LBP és sCD14 szérumszintekben arra utalhat, hogy ezek a markerek összefüggésben állnak a DCI kialakulásával. Eredményeink a DCI és a megemelkedett bélpermeabilitást jelző markerek szintje közötti kapcsolatot sugallják. Fontos kiemelni, hogy bizonyos citokinek mintázata, amelyeket aSAV-es betegek szérumában figyeltek meg, szintén összefügg a DCI kialakulásával. Tekintettel az előzőekben ismertetett LPS–LBP–sCD14 kölcsönhatásra, amely az inflammatorikus választ aktiválja, feltételezzük, hogy az aSAV során a keringésbe jutó endotoxinok közvetlen szerepet játszanak a DCI kialakulásában azáltal, hogy elindítják és fenntartják a gyulladással járó folyamatokat. Összességében, bár a vizsgált markerek nem alkalmasak a DCI korai előrejelzésére, az LBP a korai fázisban (D1) a kedvezőtlen kimenetel irányába mutat. Kiemelendő, hogy mind a sCD14, mind az LBP szignifikánsan elkülöníti a kimeneteli csoportokat a fertőzésmentes populációban, még a korai fázisban is. Ezen eredmények rávilágítanak arra, hogy ezek a biomarkerek potenciálisan alkalmasak a korai kimeneteli sztratifikációra, azonban további vizsgálatok szükségesek a kauzális szerepük tisztázásához.

6. KONKLÚZIÓ

Jelen disszertáció két egymást kiegészítő vizsgálat eredményeit integrálja, amelyek az aneurysma ruptura okozta subarachnoidalis vérzés (aSAV) utáni metabolikus változásokat és szisztémás biomarkerek alakulását vizsgálták. Eredményeik együtt kiemelik a másodlagos agysérülés dinamikus és multifaktoriális jellegét, valamint annak klinikai kimenetelre gyakorolt hatását. A metabolomikai elemzés időfüggő, jól elkülöníthető szérumszintű metabolikus mintázatokat azonosított, amelyek megkülönböztették a három hónap múlva kedvező, illetve kedvezőtlen funkcionális kimenetelű betegeket. Ezek a változások elsősorban az energiatermelés, az aminosav-forgalom és az oxidatív stressz szabályozásához kapcsolódó útvonalakat érintették. A kedvezőtlen kimenetelű csoportban a vérzés utáni késői fázisban megfigyelt metabolikus eltérések – magasabb 2-hidroxi-butirát szintek, valamint csökkent guanidinoacetát- és aminosav-koncentrációk – a keton-alapú energiatermelés felé történő eltolódást jelezhetik, még megfelelő enterális táplálás biztosítása mellett is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szisztémás metabolikus

adaptációk a betegség súlyosságát tükrözhetik és befolyásolhatják az idegrendszeri regenerációt, továbbá felvetik a célzott táplálási stratégiák potenciális szerepét a betegellátásban. Ugyanakkor a ketózis pontos patofiziológiai szerepe aSAV késői fázisában további vizsgálatokat igényel. A biomarker-vizsgálat kiterjesztette ezen megfigyeléseket azzal, hogy korai változásokat mutatott a bélpermeabilitás és a veleszületett immunválasz szérum markereiben. Az LBP és a szolubilis CD14 emelkedett szintje összefüggést mutatott a betegség súlyosságával és a klinikai kimenettel. A klinikailag igazolt fertőzés nélküli betegeknek ezek a változások arra utalnak, hogy a bélből származó gyulladástól, esetleg az endotoxin-transzlokáción keresztül, hozzájárulhat a neuroinflammációhoz és a másodlagos agysérüléshez. Összességében e két vizsgálat eredménye átfogóbb képet ad aSAV után kialakuló metabolikus és gyulladástól való válaszközpontokról. A metabolomikai és biomarker-profil együttes elemzése javíthatja a prognosztikát és ígéretes megközelítést kínál új terápiás célpontok azonosítására, valamint a személyre szabott kezelési stratégiák támogatására a jövőben.

7. TOVÁBBI KUTATÁSI TERVEK

A jövőbeni vizsgálataink célja, hogy ezen eredményeket nagyobb, multicentrikus kohorszokban validáljuk, standardizált mintagyűjtési és egységesített analitikai protokollok alkalmazásával. A több időpontban végzett hosszú távú elemzések teljesebb képet adhatnak a metabolikus és gyulladástól való válaszközpontokról, segítve a DCI korai felismerését és a hosszú távú funkcionális kimenetel előrejelzését. A metabolomikai adatok kombinálása képalkotó, genomikai és klinikai információkkal tovább segítheti erős, multimodális predikációs modellek kifejlesztését, valamint a precíziós medicina stratégiáinak támogatását aSAV-betegek ellátásában. Klinikai szempontból a biomarkerek, például az LBP és az I-FABP gyors vagy ágy melletti teszteké történő átalakítása jelentősen javíthatná a rendszerszintű szövődények korai felmérését és monitorozását. Ugyanakkor mechanisztikus vizsgálatokra is szükség van, amelyek feltárják az anyagcsere, a gyulladás és a bélbarrier-funkció kölcsönhatásait, hogy új terápiás célpontok is azonosíthatók legyenek az early brain injury mértékének csökkentésére. Összességében jelen munkánk alapot teremt a jövőbeni transzlációs kutatásokhoz, amelyek a metabolikus ismereteket a személyre szabott klinikai menedzsmenthez kapcsolják az aneurysma ruptura okozta subarachnoideális vérzés kezelésében.

8. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Orban B, Tengölics R, Zavori L, Simon D, Erdo-Bonyar S, Molnar T, Schwarcz A, Csecsei P. The Difference in Serum Metabolomic Profiles between the Good and Poor Outcome Groups at 3 Months in the Early and Late Phases of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Int J Mol Sci.* 2024 Jun 15;25(12):6597. doi: 10.3390/ijms25126597. PMID: 38928303; PMCID: PMC11203497.

IF: 4,9

Orban B, Simon D, Erdo-Bonyar S, Berki T, Molnar T, Zavori L, Schwarcz A, Peterfi Z, Csecsei P. Effects of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Patients Without In-Hospital Infection on FABP-I, LBP, and sCD-14. *Int J Mol Sci.* 2025 Jan 8;26(2):485. doi: 10.3390/ijms26020485. PMID: 39859200; PMCID: PMC11764490.

IF: 4,9

Cumulative impact factor: **9,8**

A DOLGOZATHOZ FEL NEM HASZNÁLT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK:

Csecsei P, Takacs B, Pasitka L, Varnai R, Peterfi Z, **Orban B**, Czabajszki M, Olah C, Schwarcz A. Distinct Gut Microbiota Profiles in Unruptured and Ruptured Intracranial Aneurysms: Focus on Butyrate-Producing Bacteria. *J Clin Med.* 2025 May 16;14(10):3488. doi: 10.3390/jcm14103488. PMID: 40429482; PMCID: PMC12111819.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Csécsi Péter témavezetőmnek és tanácsadómnak a folyamatos útmutatásáért, türelméért és gondos felügyeletéért a kutatási folyamat és a disszertáció elkészítése során. Szakértelme, hasznos tanácsai és állandó támogatása kulcsfontosságú volt a munka minőségének emelésében, valamint abban, hogy a projekt egész ideje alatt motivált maradjak.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Schwarcz Attilának, hogy lehetőséget biztosított számomra doktori kutatásom elvégzésére a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Idegsebészeti Klinikáján, valamint kedves bátorításáért a teljes kutatás során.

Végül szeretném megköszönni Dr. Spántler Dórának az értékes segítséget a kutatás korai szakaszában, különösen a kísérleti és mintavételi eljárások megismertetésében. Hálás vagyok továbbá az Idegsebészeti Klinika minden munkatársának az együttműködésért és a szakmai támogatásért, amely hozzájárult a munka sikeres befejezéséhez.