

Transneuronalis degeneratio a központi idegrendszerben cerebrovascularis betegségekben

Doktori értekezés

Dr. Kollai Sarolta

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Tibor, Ph.D.,

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Ferenc, Ph.D.,
Dr. Szilágyi Géza, Ph.D.,

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Réthelyi János, D.Sc.,
Tagok: Dr. Bokor Magdolna, Ph.D.,
Dr. Glasz Tibor, Ph.D.,

Budapest
2025

BEVEZETÉS

A Waller-féle degeneráció (WD) az axon idegsejt-károsodás következtében bekövetkező programozott degenerációja. A központi idegrendszeri (KIR) WD a perifériásnál lassabb és a következményes regeneráció hiányzik. Főként állatkísérleteknek köszönhetően ismerjük patológiai fázisait, humán források hiányosak, a dinamikáról leginkább mágneses rezonanciás (MR) vizsgálatok születtek az utóbbi évtizedekben, a különböző etiológiák (agyvérzés és ischaemia) összehasonlítása tekintetében azonban nem. A transzneurális degeneráció a primer laesioval szinaptikus kapcsolatban álló sejtek degenerációját jelenti. A humán adatok többsége a látórendszerből származik, ahol anterográd és retrográd degenerációt is bizonyítottak hisztopatológiai vizsgálatokkal. Emellett leírták a mamillothalamicus pálya és a corpus mamillare degenerációját temporalis lebeny epilepsziában és az arteria cerebri posterior ellátási területét érintő infarctus után; a substantia nigra és a globus pallidus másodlagos, postischaemiás érintettségét striatális infarctust követően; a thalamus degenerációját

arteria cerebri media (ACM) területi infarctus után, illetve a hypertrophiás oliva inferior degeneráció is a transzszinaptikus degeneráció egyik formája. A gerincvelőben (SpC) a másodlagos degenerációra irányuló kevés rendelkezésre álló kutatás a cerebrovaszkuláris eseményt követő krónikus fázisra koncentrál, a korai időszakból adatok nem állnak rendelkezésre.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja a corticospinalis pálya (CST) és a gerincvelő másodlagos degenerációjának feltérképezése volt cerebrovascularis betegségekben, hisztomorfológiai és immunhisztokémiai módszerek használatával. Munkánk első részében a CST degenerációját elemeztük a nyúltvelő piramisainak szintjén a microglia aktiváció illetve az axonok és a myelinhüvely strukturális károsodásán keresztül.

Célunk a patológiai folyamatok részletesebb megértése volt, különösen a stroke utáni korai időszakban, valamint a folyamat dinamikájának összehasonlítása különböző

etiológiájú betegekben, azaz haemorrhagiás és ischaemiás stroke-ban.

A gerincvelői sejtek transneuronalis degenerációját illetően az eddigi humán morfometriai vizsgálatok az agyi infarktust követő krónikus fázisra fókuszáltak, míg a sérülés utáni első hónapból nem állnak rendelkezésre hisztomorfológiai adatok, noha a CST degeneráció MRI és a motoneuronok érintettségének elektrofiziológiai jelei ekkor már nyilvánvalóak.

Ennek alapján munkánk második része (morfometriai mellett szinapszisok és a microglia aktiváció elemzésével) a gerincvelői elülső szarvmotoneuronjainak morfológiai és szinaptikus változásait célozta meg a stroke utáni első hónapban.

MÓDSZEREK

Az első vizsgálatban a CST degenerációját elemeztük a nyúltvelői pyramis területén. 22 beteget vizsgáltunk, melyek közül 11 esetben kiterjedt törzsdúci vérzés, 9 esetben az ACM teljes ellátási területét érintő ischaemiás stroke igazolódott CT-vel és post mortem neuropatológiai

vizsgálattal. 2 esetben két különböző időpontban elszenvedett bilaterális stroke volt a kórelőzményben, így bár ezek statisztikai elemzésre nem voltak alkalmasak, jól demonstrálják a késői elváltozásokat. Második vizsgálatunkban transzszinaptikus változásokat elemeztünk 7 teljes ACM területi infarctust szenvedett beteg postmortem a gerincvelői mintáin, a stroke utáni első hónapban.

30 napos formalinban történt fixálást követően 10 µm vastagságú paraffinba ágyazott metszetek készültek a nyúltvelő és a C6 szegmentum magasságában.

A gerincvelői metszetekből Nissl festést alkalmaztunk a morfológiai vizsgálatokhoz, CD 68 immunhisztokémiát a microglia aktiváció megítéléséhez és synaptophysin (SYP) immunhisztokémiát a szinapszisok vizsgálatához.

Az agytörzsi metszeteknél Klüver-Barrera festéssel vizsgáltuk a myelint, neurofilament (NF-H) immunhisztokémiával az axonok épségét és szintén CD68 immunhisztokémiával a microglia aktivációt.

A mérések során a nyúltvelőben a laesioval azonos oldali CST-t, a gerincvelőben pedig az ellenkező oldalt tekintettük kórosnak, kontrollnak mindkét esetben az ép oldalt használtuk.

A mikroszkópos felvételeket Zeiss Axio Imager M2 fénymikroszkóppal készítettük, az ehhez csatlakoztatott Zeiss Axiocam 503 színes digitális kamera, számítógép és az azon futó ZEN 2.6 számítógépes szoftver segítségével végeztük a szövettani képek elemzését.

A gerincvelői minták Nissl-festett metszetein a gerincvelői mellső sarv idegsejtjeinek (anterior horn cell, AHC) száma mellett azok átmérőjét, kerületét és keresztmetszeti területét mértük. A microglia-aktivációt a CD68-pozitív sejtek denzitásával – azaz a CD68 pozitív területek és a teljes mért terület arányával - jellemeztük, ilyen mérések az elülső sarvban és külön a Rexed IX zónában, illetve az oldalsó kötegben történtek. A szinapszisokat SYP immunhisztokémiával vizsgáltuk; denzitást mértünk a teljes elülső sarvban és a Rexed IX zónában valamint az egyes motoneuronok szinaptikus fedettségét számoltuk.

Az agytörzsi metszetekben a piramisokat anatómiai elhelyezkedésük alapján azonosítottuk. Az axonok duzzanata és szétesése nem tette lehetővé az NF-H immunreakciókvantifikálást, így itt az NF-H és KB festett képeket szemikvanitatív elemzéssel értékeltük, melynek alapját a festődés homogenitása, az axonok elrendeződése, méreteloszlása és térbeli denzitása, a KB-festett metszeteken a myelinhüvelyek felszíne, alakja és gyűrűinek teljessége adta. A microglia aktivációt a CD68 pozitív területek denzitásával értékeltük.

A morfometriai adatokat háromféleképpen dolgoztuk fel; ANOVA-t alkalmaztunk az elülső szarvak sejtejének méreteloszlásának összehasonlítására az egyes esetekben, egyesített elemzést végeztünk Mann–Whitney-próbával, a neuronokat nagy és kis sejtekre osztva khi-négyzet próbát használtunk.

Az immunhisztokémiai eredményeket együtt értékeltük: a CD68-denzitásokat a két elülső szarvban (ipsi- és kontralateralisan), a laterális kötegben és a Rexed IXzónában t-próbával hasonlítottuk össze. Ezt követően az elülső szarv és a Rexed IX zóna CD68-denzitását

ugyanazon az oldalon Sign- és Wilcoxon-próbával vetettük össze minden esetben.

A szinapszisdenzitás esetében a két oldal elülső szarvának és Rexed IXzónájának SYP-denzitását t-próbával hasonlítottuk össze. Hasonlóképpen t-próbát alkalmaztunk a nagy motoneuronok SYP-borítottságának összevetésére a két oldalon.

Az agytörzsi vizsgálatból CD68-denzitás került statisztikai feldolgozásra, itt többváltozós elemzéshez mixed-effect regressziós modelleket használtunk, emellett Wilcoxon páros próbát és Spearman-féle rangkorrelációt is használtuk a denzitásértékeknek és stroke-tól eltelt idő illetve az etiológia kapcsolatának feltárására.

EREDMÉNYEK

A corticospinalis pálya (CST) morfológiai változásai a nyúltvelőben

1–2. nap

A CD68-denzitás mindkét oldalon jelentős a nyúltvelői piramisokban, azonban a két oldal közötti különbség

ekkor még nem észlelhető. Az axonális struktúra és a myelinhüvelyek épnek tűnnek. A mikroszkópos anatómia megegyezik az ép, nem patológiás (NPAT) oldallal.

3–7. nap

Az ipsilateralis (patológiás) oldalon a CD68-denzitás már a harmadik napon fokozott, a hetedik napon ez még kifejezettebb. A 7. napon az ipsilateralis piramis körülírt területein az NF-H festés az axonstruktúra meg bomlásának első jeleit mutatja: megduzzadt axonkeresztmetszetek láthatók, ami mellett a myelin degradációjának korai jelei is megjelennek.

10–18. nap

A két oldal közötti CD68-denzitás különbsége továbbra is kifejezett. Az axondegeneráció jelei nyilvánvalóak: az axonok megduzzadnak, szerkezetük integritása elveszik, eltűnik a nyúltvelő ipsilateralis oldalának szabályos szerkezeti mintázata. A myelin degradáció jelei KB-festéssel több helyen is markánsak: a myelinyűrűk elveszítik szabályos kerek formájukat, több helyen megszakadnak.

1 hónap után

A CD68-denzitás két oldal közötti kifejezett különbsége továbbra is fennáll, az axondegeneráció jelei egyértelműek. A myelin degradáció jelei még szembetűnőbbé válnak: a festődés intenzitása csökken, és csak szórványosan láthatók myelinyűrűk. A patológia súlyossága három hónap után is hasonló marad.

1 év után

A két késői esetben (D330 és D450) a CD68-pozitív sejtek száma továbbra is több a patológiás oldalon, a nyúltvelő piramis széli részén sűrű microglia- és macrophagszorulat látható. Az axonsűrűség drámaian csökkent, a megmaradt rostok vékonyabbak az ép oldalhoz képest. A myelinfestődés jelentősen gyengült, de a myelin degradáció jelei még mindig fennállnak.

A vérzéses (HEM) és az ischaemiás (ISC) stroke-esetek összehasonlítása

A HEM és ISC csoportok összehasonlításakor az ipsilateralis oldalon a teljes CD68-denzitás (HEM $n = 11$ (átlag $\pm$ SD): 12515 ± 8127); (ISC $n = 9$ (átlag $\pm$ SD):

14871 $\pm$ 5639); (összes eset n = 20 (átlag $\pm$ SD): 13353 $\pm$ 6898) körülbelül kétszerese volt a kontralaterális oldalénak (HEM n = 11 (átlag $\pm$ SD): 6937 $\pm$ 2151); (ISC n = 9 (átlag $\pm$ SD): 7866 $\pm$ 3751); (összes eset n = 20 (átlag $\pm$ SD): 7436 $\pm$ 2898) mindkét betegcsoportban (Wilcoxon páros próba p(összes eset) = 0,0005). A patológiás oldalak összehasonlításakor HEM és ISC között nem mutatkozott különbség (p = 0,4780).

A teljes csoport és a HEM és ISC csoportokat külön elemezve is, az időt folytonos változóként kezelve, az ipsilaterális oldali CD68-denzitás szignifikánsan korrelált a túlélési idővel (Spearman rangkorreláció n = 20 p < 0,0001 ; HEM n = 11 p = 0,005; ISC n = 9 p = 0,013).

Hasonló eredményt kaptunk, ha a betegeket négy időcsoportba osztottuk: az ipsilaterális oldalon a denzitás szignifikánsan eltért az időcsoportok között (Kruskal–Wallis ANOVA n = 20 p = 0,0047), a kontralaterális oldalon nem volt kimutatható hasonló összefüggés.

A multivariáns elemzés során, mixed-effect regressziós modell alkalmazásával a CD68-denzitás független prediktorai a túlélési idő (p = 0,003 a lineáris és p = 0,248

a nem lineáris komponensre), valamint az elváltozás oldala (ipsi- vs. kontralateralis; $p < 0,001$) voltak, de a nem, az életkor vagy a stroke típusa nem.

AHC-morfometria

A morfometriai adatok nem igazoltak neuronvesztést a gerincvelő contralateralis elülső szarvában (AH) az ACM-infarktust követő első 30 napban ($p = 0,13$). A D3 esetekben a kontralateralis oldali sejtek szignifikánsan kisebbek voltak, míg a D6–7 esetekben szignifikánsan nagyobbak mindhárom paraméter tekintetében. Az esetek egyedi értékelésekor hasonló eredmények születtek, de a különbség csak a 6 napos és az egyik 3 napos esetben volt szignifikáns ($p = 0,00001$; $p = 0,00001$; $p = 0,00001$ a 6 napos esetben, illetve $p = 0,009061$; $p = 0,008247$; $p = 0,030579$ a 3 napos esetben). A D17 és D32 betegekben ezekben a paraméterekben nem volt szignifikáns különbség az ipsi- és contralateralis oldal között.

number (n)	Cross sectional area (μm²)				Diameter (μm)			Perimeter	
	CONT	IPSI	CONT	p	IPSI	CONT	p	IPSI	CONT
3142	403,9±292,8	388,3± 290,7	0,006	21,3±7,5	20,8±7,6	0,006	86,5±37,0	84,9±3	
2125	366,8±287,4	416,9±335,879	>0.000	20,3±7,4	21,5±8,2	>0.000	80,2±34,3	85,4±3	
1044	332,8±207,1	342,9±200,574	0,103	19,6±6,0	20,0±5,9	0,103	80,9±32,2	82,8±3	
1182	371,5±312,0	387,9±320,630	0,312	20,2±8,0	20,6±8,2	0,312	91,1±60,8	97,1±1	

1. táblázat

Microglia aktivitás a gerincvelőben

A CD68 immunhisztokémia jelentős denzitásnövekedést mutatott a teljes contralateralis elülső szarvban (ipsilateralis oldal: átlag $\pm$ SD: 0,0020 $\pm$ 0,0014; contralateralis oldal: átlag $\pm$ SD: 0,0039 $\pm$ 0,0024; n = 21; p = 0,0008). Ez a különbség már a harmadik napon az ACM-occlusiót követően észlelhető volt, és később sem szűnt meg. A contralateralis oldalon a CD68-denzitás magasabb volt a Rexed IX. laminájában, mint a teljes AH-ban (CD68-denzitás a Rexed IX. laminában: ipsilateralis: átlag $\pm$ SD: 0,0020 $\pm$ 0,0015; contralateralis: átlag $\pm$ SD: 0,0049 $\pm$ 0,0031; Sign-teszt: n = 21; p = 0,0088; Wilcoxon:

$n = 21$; $p = 0,0172$), míg az ipsilateralis oldalon hasonló eloszlásbeli különbség nem volt megfigyelhető.

Hasonlóan markáns különbség mutatkozott a CD68-denzitásban a CST lateralis kötegében is: a contralateralis oldalon magasabb értékeket találtunk az ép ipsilateralis oldalhoz képest (ipsilateralis oldal: átlag $\pm$ SD: $0,0024 \pm 0,0016$; contralateralis oldal: átlag $\pm$ SD: $0,0058 \pm 0,0034$; $p = 0,0008$).

A szinapszisok változása az AH-ban

A SYP-denzitás (összes eset) mind a teljes AH-ban, mind a Rexed IX. laminában azonosnak bizonyult a két oldalon (SYP-denzitás ipsilateralis oldal: átlag $\pm$ SD: $0,2731 \pm 0,0878$; contralateralis oldal: átlag $\pm$ SD: $0,2683 \pm 0,0870$; $n = 21$; $p = 0,4020$).

Ezzel szemben az egyes motoneuronok SYP-borítottsága (összes eset) szignifikánsan csökkent a contralateralis oldalon (ipsilateralis: átlag $\pm$ SD: $0,8341 \pm 0,1298$; contralateralis: átlag $\pm$ SD: $0,7557 \pm 0,1499$; $n = 70$; $p = 0,0001$).

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A microglia-aktiváció a nyúltvelő CST-jében, valamint a gerincvelő cervicalis szakaszának laterális kötegében és elülső szarvában már a 3. napon kimutatható, mint a WD jelee vérzéses és ischaemiás stroke után. Az elülső szarvban való megjelenése nem egyenletes, elsősorban a lamina IX-et érinti, ahol a nagy motoneuronok találhatók. Nem mutat rostrocaudalis mintázatot, ugyanakkor az első hónap során fokozatosan kifejezettebbé válik.

2. A microglia-aktivációt követően 7–10 nappal a stroke után a nyúltvelő szintjén a myelin és az axon strukturális károsodása figyelhető meg. Ez a folyamat lassú, és hónapokig is eltart. Az axondegeneráció dinamikája ischaemiás és vérzéses stroke esetében hasonló.

3. A gerincvelő elülső szarvában a microglia korai aktivációja mellett az elülső szarvsejtek strukturális változása is megfigyelhető. A stroke után 7 nappal a sejtek nagyobbak és duzzadtabbnak látszanak a kontralaterális oldalhoz képest, ez a jelenség főként a nagy alfa-motoneuronokat érinti. Ez azonban átmeneti, későbbi időpontokban már nem volt kimutatható különbség.

4. A szinapszisdenzitás vizsgálatakor nem volt eltérés a két oldal elülső szarvai között, ugyanakkor az egyes motoneuronok felszínén a szinaptikus végződések száma csökkent, ami másodlagos károsodásra és a szinapszisok reorganizációjára utal.

5. Szövetteni vizsgálataink alátámasztják a korábbi elektrofiziológiai eredményeket, amelyek már korábban felvetették a gerincvelői motoneuronok transzneuronalis funkcionális károsodását.

6. Eredményeink ráirányíthatják a figyelmet a stroke utáni másodlagos változásokra, így a transzszinaptikus degenerációra és a microglia aktivációjára, ösztönözve további részletes kutatásokat. Ezek mélyebb elemzése a jövőben potenciális terápiás célpontokat azonosíthat a neurorehabilitáció és neuroprotekción területén.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Kollai, S. ; Bereczki, D. ; Glasz, T. ; Hortobágyi, Tibor ; Kovács, T. Early histopathological changes of secondary degeneration in the spinal cord after total MCA territory stroke SCIENTIFIC REPORTS 13 : 1 Paper: 21934 , 9 p. (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-49230-x

Kollai, S. ; Bereczki, D. ; Dobi, B. ; Glasz, T. ; Kovács, T. Histopathological Changes of the Corticospinal Tract Following Hemorrhagic and Ischemic Stroke BRAIN SCIENCES 15 : 8 p. 864 (2025) DOI: 10.3390/brainsci15080864

Egyéb publikáció:

Varga, G ✉ ; Mikala, G ; Gopcsa, L ; Csukly, Z ; Kollai, S ; Balázs, G ; Timár, B ; Wohner, N ; Horváth, L ; Szombath, G et al. Multiple Myeloma of the Central Nervous System: 13 Cases and Review of the Literature JOURNAL OF ONCOLOGY 2018 Paper: 3970169 , 7 p. (2018) DOI: 10.1155/2018/3970169